Promega

Manuel Technique

PowerPlex® S5 System

MODE D'EMPLOI DES PRODUITS DC6951 ET DC6950

www.promega.com

IMPRIMÉ AUX ÉTATS-UNIS.
RÉVISÉ 8/12

Réf. TMD021

PowerPlex® S5 System

Toute la documentation technique est disponible sur Internet à l'adresse : www.promega.com/tbs/
Veuillez consulter ce site Internet pour vérifier que vous utilisez la version la plus à jour de ce manuel technique.
Si vous avez des questions sur l'utilisation de ce système, veuillez contacter le service technique de Promega.
Adresse électronique : genetic@promega.com

1. Description 2

2. Composants du produit et conditions de stockage 3

3. Avant de commencer 5
- A. Précautions 5
- B. Standardisation de la matrice ou calibrage spectral 5

4. Protocoles d'amplification de l'ADN à l'aide du système PowerPlex® S5 6
- A. Mise en place de l'amplification 6
- B. Cycle thermique d'amplification 8

5. Configuration de l'instrument et préparation des échantillons 9
- A. Détection des fragments amplifiés à l'aide du ABI PRISM® 3100 ou 3100-*Avant* Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données, Version 2.0, et du Applied Biosystems 3130 ou 3130*xl* Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données, Version 3.0 9
- B. Détection des fragments amplifiés à l'aide du ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données, Version 1.0.1 ou 1.1 12
- C. Détection des fragments amplifiés à l'aide du ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer 14

6. Analyse des données 17
- A. PowerPlex® Panel et Bin Sets avec GeneMapper® *ID*, Version 3.2 17
- B. Création d'une méthode d'analyse à l'aide du logiciel GeneMapper® *ID* 18
- C. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel GeneScan® et des systèmes d'exploitation PC 22
- D. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel GeneScan® et des systèmes d'exploitation Macintosh® 23
- E. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel Genotyper® et du macro PowerTyper™ S5 24
- F. Contrôles 26
- G. Résultats 27

7. Dépannage 29
- A. Amplification et détection des fragments 29
- B. Logiciel d'analyse GeneMapper® *ID* 31
- C. Macro PowerTyper™ S5 34

8. Références 36

9. Annexe 38
- A. Avantages de l'utilisation des locus inclus dans le système PowerPlex® S5 38
- B. Méthodes d'extraction et de quantification de l'ADN 40
- C. Internal Lane Standard 600 (standard interne) 40
- D. Préparation du mélange d'amplification PCR pour le système PowerPlex® S5 41
- E. Composition des tampons et solutions 41
- F. Produits associés 42

Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 États-Unis · Numéro vert aux États-Unis 800-356-9526 · Téléphone +1-608-274-4330 · Fax +1-608-277-2516 · **www.promega.com**

Imprimé aux États-Unis. Réf. TMD021
Révisé 8/12

1. Description

Les locus STR (« short tandem repeat », microsatellites) sont des éléments de séquence répétées courtes de 3 à 7 paires de bases (1–4). Ces répétitions sont largement distribuées dans le génome humain tout entier et constituent une riche source de marqueurs hautement polymorphiques pouvant être détectés par amplification en chaîne par polymérase (PCR) (5–8). Les allèles des locus STR se différencient par le nombre de copies de la séquence répétée comprise dans la région amplifiée et se distinguent l'un de l'autre après séparation par électrophorèse à l'aide d'une détection radioactive, fluorescente ou par coloration à l'argent.

Le système PowerPlex® S5 [a–c] permet la co-amplification et la détection de cinq locus (quatre locus STR et l'amélogénine), à savoir D8S1179, D18S51, amélogénine, FGA et TH01. Une amorce spécifique pour chacun des locus Amélogénine, D18S51 et D8S1179 est marquée à la fluorescéine (FL) et une amorce spécifique pour chacun des locus TH01 et FGA est marquée à la 6-carboxy-4´,5´-dichloro-2´,7´-diméthoxy-fluorescéine (JOE). Les cinq locus sont amplifiés simultanément dans un seul tube et analysés en une seule injection.

Le système PowerPlex® S5 est compatible avec les analyseurs suivants : ABI PRISM® 310, 3100 et 3100-*Avant* et Applied Biosystems 3130 et 3130*xl*. Les protocoles présentés dans le présent manuel ont été testés par Promega Corporation. Les appareils d'amplification et de détections peuvent varier. Il peut être nécessaire d'optimiser les protocoles, y compris le nombre de cycles et la durée de l'injection (ou le volume de charge) pour chaque appareil de laboratoire. Une validation interne doit être effectuée.

Le système PowerPlex® S5 offre tout le matériel nécessaire à l'amplification des régions STR à partir d'ADN génomique purifié. Ce manuel comporte un protocole pour l'utilisation du système PowerPlex® S5 à l'aide des thermocycleurs 2720 et GeneAmp® PCR system 9600, 9700 et 2400 d'Applied Biosystems, ainsi que des protocoles décrivant la séparation des produits de l'amplification et la détection du matériel séparé (Figure 1). Les protocoles décrivant l'utilisation des appareils de détection de la fluorescence doivent être obtenus auprès des fabricants de ceux-ci.

Des informations sur d'autres systèmes STR fluorescents de Promega et sur la détection par coloration à l'argent de fragments de STR amplifiés sont disponible sur demande auprès de Promega ou en ligne à : **www.promega.com**

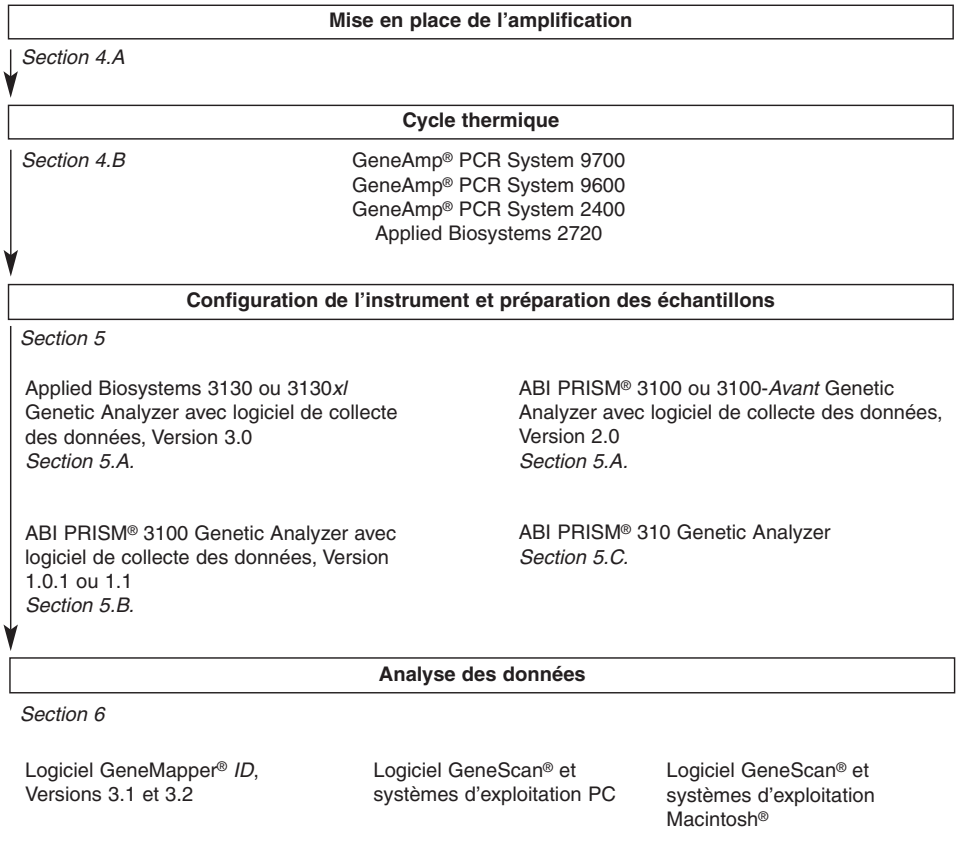
Mise en place de l'amplification
Section 4.A
Cycle thermique
Section 4.B
GeneAmp® PCR System 9700
GeneAmp® PCR System 9600
GeneAmp® PCR System 2400
Applied Biosystems 2720
Configuration de l'instrument et préparation des échantillons
Section 5
Applied Biosystems 3130 ou 3130xl Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données, Version 3.0
Section 5.A.
ABI PRISM® 3100 ou 3100-Avant Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données, Version 2.0
Section 5.A.
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer avec logiciel de collecte des données, Version 1.0.1 ou 1.1
Section 5.B.
ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer
Section 5.C.
Analyse des données
Section 6
Logiciel GeneMapper® ID, Versions 3.1 et 3.2
Logiciel GeneScan® et systèmes d'exploitation PC
Logiciel GeneScan® et systèmes d'exploitation Macintosh®

Figure 1. Vue d'ensemble du protocole du système PowerPlex® S5.

2. Composants du produit et conditions de stockage

Produit	Conditionnement	Réf.
PowerPlex® S5 System	100 réactions	DC6951

Non prévu pour le diagnostic médical. Le produit DC6951 contient assez de réactifs pour 100 réactions de 25 µl chacune. Comprend :

Boîte des composants de préamplification (étiquette bleue)

500 µl	PowerPlex® S5 5X Master Mix
250 µl	PowerPlex® S5 10X Primer Pair Mix (mélange de paires d'amorces)
25 µl	2800M Control DNA, 10 ng/µl
5 × 1250 µl	Eau de qualité amplification

Boîte des composants de post-amplification (étiquette beige)

25 µl	PowerPlex® S5 Allelic Ladder Mix (mélange d'échelle allélique)
150 µl	Internal Lane Standard (ILS) 600 (standard interne)
1	Protocole

2. Composants du produit et conditions de stockage (suite)

Produit	Conditionnement	Réf.
PowerPlex® S5 System	400 réactions	DC6950

Non prévu pour le diagnostic médical. Le produit DC6951 contient assez de réactifs pour 400 réactions de 25 µl chacune. Comprend :

Boîte des composants de préamplification (étiquette bleue)

4 × 500 µl	PowerPlex® S5 5X Master Mix
4 × 250 µl	PowerPlex® S5 10X Primer Pair Mix (mélange de paires d'amorces)
25 µl	2800M Control DNA, 10 ng/µl
10 × 1250 µl	Eau de qualité amplification

Boîte des composants de post-amplification (étiquette beige)

4 × 25 µl	PowerPlex® S5 Allelic Ladder Mix (mélange d'échelle allélique)
4 × 150 µl	Internal Lane Standard (ILS) 600 (standard interne)
1	Protocole

Le mélange d'échelle allélique PowerPlex® S5 Allelic Ladder Mix est expédié dans un sac scellé individuel. Après ouverture, ce composant doit être placé dans la boîte de post-amplification. L'eau de qualité amplification est expédiée dans un sac scellé individuel. Après ouverture, ce composant doit être placé dans la boîte de préamplification.

Conditions de stockage : Stocker tous les composants sauf le contrôle d'ADN 2800M entre -30 ° C et -10 ° C dans un congélateur anti-givre. Conservez le contrôle d'ADN 2800M entre 2 et 10 ° C. Le mélange de paires d'amorces PowerPlex® S5 10X, le mélange d'échelle allélique PowerPlex® S5 et le standard interne 600 sont sensibles à la lumière et doivent être stockés à l'abri de celle-ci. Nous vous recommandons expressément de stocker séparément les réactifs de préamplification et de post-amplification et de les utiliser à part, avec des pipettes, portoirs de tubes etc. différents.

Le Macro PowerTyper™ S5, à utiliser avec le logiciel Genotyper®, peut être téléchargé au site : **www.promega.com/geneticidtools/**

Les fichiers de panels et bins appropriés à utiliser avec le logiciel GeneMapper® *ID* peuvent être obtenus au site Web de Promega à l'adresse : **www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/**

Des standards de matrice sont nécessaires pour la configuration initiale de la matrice de séparation des couleurs. Les standards de matrice sont vendus séparément et sont disponibles pour les analyseurs suivants : ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (PowerPlex® Matrix Standards, 310; Réf. DG4640) et ABI PRISM® 3100 et 3100-*Avant* et Applied Biosystems 3130 et 3130*xl* Genetic Analyzers (PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130; Réf. DG4650). Reportez-vous à la section 9.F pour les informations au sujet des commandes.

3. Avant de commencer

3.A. Précautions

L'application des méthodes de typage basées sur la PCR à la médecine légale ou aux études de cas de paternité nécessite des études de validation et des mesures de contrôle de la qualité dépassant le cadre de ce manuel (9–11). La qualité de l'ADN purifié ainsi que des légères modifications des tampons, de la force ionique, des concentrations des amorces, du choix du thermocycleur et des conditions des cycles thermiques peuvent influencer la réussite de la PCR. Nous vous suggérons d'adhérer à la lettre aux procédures recommandées d'amplification et de détection de la fluorescence.

L'analyse des STR basée sur PCR est susceptible à la contamination par de très petites quantités d'ADN humain non-matrice. Des précautions extrêmes doivent être prises pour éviter la contamination croisée lors de la préparation des échantillons d'ADN, de la manipulation des paires d'amorces, de la mise en place des réactions d'amplification et de l'analyse des produits de l'amplification. Les réactifs et le matériel utilisés avant l'amplification (PowerPlex® S5 5X Master Mix, PowerPlex® S5 10X Primer Pair Mix, eau de qualité amplification, et ADN 2800M) sont fournis dans une boîte séparée et doivent être stockés à part des composants utilisés après l'amplification (PowerPlex® S5 Allelic Ladder Mix et Internal Lane Standard 600). Il faut toujours utiliser une réaction de contrôle négatif (sans matrice) pour détecter une contamination éventuelle des réactifs. Nous vous recommandons vivement d'utiliser des gants et des cônes de pipettes résistants aux aérosols (par ex. les cônes ART®, Section 9.F).

3.B. Standardisation de la matrice ou calibrage spectral

La création d'un fichier de matrice approprié est essentielle pour l'évaluation des systèmes multicolores à l'aide des analyseurs ABI PRISM® 310, 3100 et 3100-*Avant* et Applied Biosystems 3130 et 3130*xl*. Une matrice doit être créée pour chaque appareil individuel.

Les standards de matrice PowerPlex®, 310 (réf. DG4640) sont requis pour la standardisation de la matrice de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310. Pour des résultats optimaux, les standards de matrice PowerPlex®, 3100/3130 (réf. DG4650) ne doivent pas être utilisés pour la création d'une matrice sur l'analyseur génétique ABI PRISM® 310.

Les standards de matrice PowerPlex®, 3100/3130 (réf. DG4650) sont requis pour la standardisation de la matrice des analyseurs génétiques ABI PRISM® 3100 et 3100-*Avant*, et Applied Biosystems 3130 et 3130*xl*. Les standards de matrice PowerPlex®, 310 (réf. DG4640) ne peuvent pas être utilisés pour créer une matrice sur ces appareils.

Pour obtenir des protocoles et informations supplémentaires sur la standardisation des matrices, reportez-vous au *Bulletin technique nº. TBD021 des standards de matrice PowerPlex®, 310*, fourni avec le produit DG4640. Pour obtenir des protocoles et informations supplémentaires sur le calibrage spectral, reportez-vous au *Bulletin technique nº. TBD022 des standards de matrice PowerPlex® , 3100/3130*, fourni avec le produit DG4650. Ces manuels sont disponibles sur demande auprès de Promega ou en ligne à : **www.promega.com/tbs/**

4. Protocoles d'amplification de l'ADN à l'aide du système PowerPlex® S5

Matériel à fournir par l'utilisateur

- Thermocycleur Applied Biosystems 2720 ou GeneAmp® PCR System 9600, 9700 ou 2400 (Applied Biosystems)
- microcentrifugeuse
- tubes à réaction MicroAmp® de 0,2 ml ou plaque à réaction optique MicroAmp® à 96 puits (Applied Biosystems)
- tubes à microcentrifugation de 1,5 ml, ambrés (Fisher, réf. 05-402-26)
- cônes de pipettes résistants aux aérosols (Section 9.F)

En général, entre 0,25 et 0,5 ng d'ADN matrice sont amplifiés dans un volume de réaction de 25 µl en suivant les protocoles décrits ci-dessous. Des pics saturés peuvent être présents en cas d'utilisation d'une quantité de matrice en excès de la quantité recommandée. Si vous utilisez des quantités élevées de matrice, réduisez la quantité d'ADN de matrice ou le nombre de cycles (25–28 cycles).

Le système PowerPlex® S5 est optimisé pour le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700. Des protocoles d'amplification sont fournis pour les thermocycleurs Applied Biosystems 2720 et GeneAmp® PCR Systems 9600 et 2400.

4.A. Mise en place de l'amplification

L'utilisation de gants et de cônes de pipettes résistants aux aérosols est vivement recommandée pour éviter la contamination croisée. Gardez tous les réactifs de préamplification et de post-amplification dans des pièces séparées. Préparez les réactions d'amplification dans un local réservé à cet effet. Utilisez de l'équipement et des fournitures réservées à la mise en place de l'amplification.

Une attention méticuleuse est essentielle pour permettre une amplification réussie. Un guide de dépannage de l'amplification est fourni à la Section 7.A.

1. Décongelez entièrement le Master Mix PowerPlex® S5 5X, le mélange de paires d'amorces PowerPlex® S5 10X et l'ADN 2800M.

   Remarque : mélangez chaque tube de réactif au vortex pendant 15 secondes avant chaque utilisation. Ne centrifugez pas le mélange de paires d'amorces 10X, car cela peut entraîner une sédimentation des amorces au fond du tube.

2. Déterminez le nombre de réactions à effectuer. Ceci doit comprendre les réactions de contrôles positifs et négatifs. Ajoutez une ou deux réactions à ce nombre pour tenir compte des erreurs de pipetage. Bien que cette approche gaspille une petite quantité de chaque réactif, elle permet de garantir que vous aurez assez de mélange d'amplification PCR pour tous les échantillons. En outre, elle garantit que chaque réaction contient un mélange d'amplification identique.

3. Pour chaque réaction, placez un tube d'amplification de 0,2 ml sur un portoir et marquez-le de façon appropriée. Vous pouvez également utiliser une plaque MicroAmp® marquée de façon appropriée.

4. Ajoutez le volume final de chaque réactif indiqué au Tableau 1 dans un tube stérile de 1,5 ml de couleur ambrée. Mélanger doucement.

   Le Tableau 1 indique le volume de chaque composant par réaction. Une fiche de calcul de la quantité nécessaire de chaque composant du mélange d'amplification PCR est fournie à la Section 9.D (Tableau 5).

   Remarque : au cours de tests effectués chez Promega, nous avons trouvé que les réactions peuvent rester à température ambiante jusqu'à 4 heures après la mise en place avant d'effectuer les cycles thermiques, sans effet négatif sur les résultats de l'amplification.

   Tableau 1. Mélange d'amplification PCR pour le système PowerPlex® S5.

Composant du mélange d'amplification PCR[1]	Volume par réaction
Eau de qualité amplification	à un volume final de 25,0 µl
PowerPlex® S5 5X Master Mix	5,0 µl
PowerPlex® S5 10X Primer Pair Mix	2,5 µl
ADN matrice (0,25–0,5 ng)[2]	jusqu'à 17,5 µl
volume total de réaction	**25 µl**

[1]D'abord ajouter l'eau de qualité amplification au mélange d'amplification PCR, puis ajouter le PowerPlex® S5 5X Master Mix et le mélange de paires d'amorces PowerPlex® S5 10X. La matrice sera ajoutée à l'étape 7.

[2]Stocker les ADN matrices dans de l'eau de qualité amplification ou du tampon TE^{-4} (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1 mM EDTA). Si l'ADN matrice est stocké dans du tampon TE qui n'est pas au pH 8,0 ou qui contient une concentration plus élevée en EDTA, le volume de l'échantillon d'ADN utilisé ne doit pas dépasser 20 % du volume final de la réaction. L'efficacité et la qualité de l'amplification par PCR peuvent varier fortement en fonction de changements du pH (provoqué par l'ajout de Tris-HCl), de la concentration en magnésium disponible (en raison de sa chélation par EDTA) ou d'autres inhibiteurs de la PCR pouvant être présents en faibles quantités selon la source de l'ADN matrice et la procédure d'extraction utilisée.

5. Mélangez au vortex le mélange d'amplification pendant 5 à 10 secondes.

Remarque : si le mélange d'amplification n'est pas suffisamment mélangé au vortex, une mauvaise amplification, des déséquilibres de la hauteur des pics et des pics supplémentaires dans une plage de 50 à 80 pb peuvent subvenir.

6. Pipetez le volume approprié de mélange d'amplification dans chaque tube de réaction.

7. Pipetez ensuite l'ADN matrice (0,25–0,5 ng) pour chaque échantillon dans le tube qui contient le mélange d'amplification correspondant.

8. Pour le contrôle positif d'amplification, vortexer le tube d'ADN contrôle 2800M, puis diluer un aliquote de manière à obtenir 0,5 ng dans le volume final d'ADN choisi. Pipeter 0,5 ng d'ADN contrôle 2800M dilué dans un tube de réaction contenant le mélange d'amplification PCR.

   Remarque: Pour stocker l'ADN de contrôle 2800M dilué, diluer l'ADN à 0.5ng/µl dans le tampon TE-4 avec 20µg/ml de glycogène et conserver à 4 ° C. Ne pas stocker les dilutions effectuées dans l'eau.

9. Pour le contrôle négatif d'amplification, pipetez de l'eau de qualité amplification (au lieu d'ADN matrice) dans un tube de réaction contenant le mélange d'amplification PCR.

Éliminez les bulles d'air présentes au fond des tubes en pipetant avec soin ou en centrifugeant brièvement les tubes ou plaques. Si les bulles ne sont pas retirées, des résultats inégaux peuvent être obtenus.

4.B. Cycle thermique d'amplification

Les appareils d'amplification et de détections peuvent varier. Il peut être nécessaire d'optimiser les protocoles, y compris le nombre de cycles et la durée de l'injection pour chaque appareil de laboratoire. Des tests menés chez Promega ont indiqué que 30 cycles sont adéquats pour 0,25–0,5 ng d'ADN purifié. Augmentez le nombre de cycles (32–34 cycles) pour améliorer la sensibilité si des faibles quantités d'ADN matrice sont utilisés. Vous pouvez diminuer le nombre de cycles si une quantité plus importante de matrice est ajoutée aux réactions. Dans le cas de réactions contenant ≥ 1 ng d'ADN, le nombre de cycles peut être réduit à 25–28 cycles. Une validation interne doit être effectuée.

1. Placez les tubes ou la plaque MicroAmp® dans un thermocycleur.
2. Exécutez les protocoles recommandés ci-dessous pour les thermocycleurs GeneAmp® PCR System 9600, 9700 et 2400, et Applied Biosystems 2720.

   Pour les informations sur d'autres modèles de thermocycleurs, veuillez contacter le service technique de Promega par courriel : **genetic@promega.com**

Protocole de cycle thermique[1]
96 °C pendant 2 minutes, puis :
94 °C pendant 30 secondes 60 °C pendant 2 minutes 72 °C pendant 90 secondes pendant 30 cycles, puis :
60 °C pendant 45 minutes
Trempe à 4 °C

[1]En cas d'utilisation du thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700, utiliser l'option de méthode, vitesse de rampe : 9600.

3. Une fois le protocole de cycles thermiques achevé, stockez les échantillons à –20 °C dans une boîte à l'abri de la lumière.

Remarques :

1. Le stockage des échantillons amplifiés à une température de 4 °C ou plus élevée peut produire des produits de dégradations.
2. Un précipité peut se former au cours de l'amplification. Ce précipité n'a pas d'effet sur les performances en aval de l'analyse ou de l'électrophorèse capillaire.

5. Configuration de l'instrument et préparation des échantillons

5.A. Détection des fragments amplifiés à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100 ou 3100-*Avant* avec le logiciel de collecte des données, Version 2.0, et de l'analyseur génétique Applied Biosystems 3130 ou 3130*xl* avec le logiciel de collecte des données, Version 3.0

Matériel à fournir par l'utilisateur

- bloc chauffant, bain-marie ou thermocycleur
- glace pilée ou bain d'eau glacée
- centrifuge compatible avec les plaques à 96 puits
- cônes de pipettes résistants aux aérosols
- réseau de capillaire 3100 ou 3130, 36 cm
- polymère à performance optimisée (POP-4™) pour le 3100 ou le 3130
- tampon d'analyse génétique 10X avec EDTA
- plaque optique MicroAmp® à 96 puits et septums
- formamide Hi-Di™ (Applied Biosystems réf. 4311320)
- Standards de matrice PowerPlex®, 3100/3130 (réf. DG4650)

La qualité du formamide est d'importance critique. Utilisez du formamide Hi-Di™ ayant une conductivité de moins de 100 µS/cm. Congelez le formamide en aliquotes à –20 °C. Des cycles multiples de congélation-décongélation ou le stockage à long terme à 4 °C peuvent provoquer une dégradation du formamide. Si la conductivité du formamide est de plus de 100 µS/cm, il peut contenir des ions qui entrent en compétition avec l'ADN pendant l'injection, ce qui provoque des pics plus bas et une sensibilité réduite. Une durée d'injection prolongée peut ne pas augmenter le signal.

Attention : le formamide est un irritant et un tératogène. Évitez l'inhalation et le contact avec la peau. Lisez l'étiquette d'avertissement et prenez les précautions appropriées lors de la manipulation de cette substance. Portez toujours des gants et des lunettes protectrices pour le travail avec le formamide.

Préparation des échantillons

1. Préparez un cocktail de charge en combinant et en mélangeant le standard interne (Internal Lane Standard 600) et le formamide Hi-Di™ comme suit :

   [(0,5 µl ILS 600) × (nb. d'injections)] + [(9,5 µl formamide Hi-Di™) × (nb. d'injections)]

   Remarque : le volume de standard interne utilisé dans le cocktail de charge peut être augmenté ou réduit pour ajuster l'intensité des pics des standards de taille. La hauteur optimale des pics pour le fragment de 100 bases du standard interne est de 500 à 1000 RFU. Si les pics sont trop bas, nous vous recommandons de modifier le mélange de formamide/standards internes de façon à ce qu'il contienne 1,0 µl d'ILS 600 et 9,0 µl de formamide Hi-Di™. Si les pics sont trop hauts, nous vous recommandons de modifier le mélange de formamide/standards internes de façon à ce qu'il contienne 0,25 µl d'ILS 600 et 9,75 µl de formamide Hi-Di™.

2. Mélangez au vortex pendant 10 à 15 secondes.

3. Pipetez 10 µl du mélange de formamide/standard interne dans chaque puits.

5.A. Détection des fragments amplifiés à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100 ou 3100-*Avant* avec le logiciel de collecte des données, Version 2.0, et de l'analyseur génétique Applied Biosystems 3130 ou 3130*xl* avec le logiciel de collecte des données, Version 3.0 (suite)

4. Ajoutez 1 µl d'échantillon amplifié (ou 1 µl de mélange d'échelle allélique). Recouvrez les puits des septums adaptés.

   Remarques :

   1. Les limites de détection des appareils pouvant varier, il peut être nécessaire d'augmenter ou de réduire la durée ou le voltage d'injection ou la quantité de produit mélangé au cocktail de charge. Utilisez le « Module Manager » (gérant du module) dans le menu des outils pour modifier la durée de l'injection ou le voltage dans le module d'exécution.
   2. Un précipité peut se former au cours de l'amplification. Ce précipité n'a pas d'effet sur les performances en aval de l'analyse ou de l'électrophorèse capillaire.

5. Centrifugez brièvement la plaque pour éliminer les bulles d'air des puits, si nécessaire.

6. Dénaturez les échantillons à 95 °C pendant 3 minutes, puis refroidissez immédiatement sur de la glace ou dans un bain d'eau glacée pendant 3 minutes. Dénaturez les échantillons juste avant de les charger sur l'appareil.

Préparation de l'appareil

Reportez-vous au manuel de l'appareil pour obtenir les instructions concernant le nettoyage des blocs de pompes, l'installation du réseau de capillaires, l'exécution d'un calibrage spatial et le chargement de polymère dans la seringue de réserve.

Analysez les échantillons comme décrit dans le manuel de l'utilisateur de l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100 ou 3100-*Avant* avec le logiciel de collecte des données, Version 2.0, ou de l'analyseur génétique Applied Biosystems 3130 ou 3130*xl*, avec les exceptions ci-dessous.

1. Dans le « Module Manager » (gérant du module), sélectionnez « New » (nouveau). Sélectionnez « Regular » (normal) dans le menu déroulant Type, puis sélectionnez « HIDFragmentAnalysis36_POP4 » dans le menu déroulant Template (matrice). Confirmez que la durée d'injection est de 5 secondes et que le voltage d'injection est de 3 kV. Changez la durée de l'exécution à 1200 secondes. Donnez un nouveau nom à votre module d'exécution, puis sélectionnez « OK ».

   Remarque : la sensibilité peut varier selon les appareils. La durée et le voltage d'injection peuvent être ajustés dans le gérant du module. La plage suggérée de durée d'injection est de 3 à 15 secondes et celle du voltage d'injection est de 1 à 5 kV.

2. Dans le « Protocol Manager » (gérant du protocole), sélectionnez « New » (nouveau). Tapez un nom pour votre protocole. Sélectionnez « Regular » (normal) dans le menu déroulant Type, puis sélectionnez le module d'exécution que vous avez créé plus haut dans le menu déroulant « Run Module » (module d'exécution). Enfin, sélectionnez « F » dans le menu déroulant « Dye-Set » (jeu de marqueurs). Sélectionnez « OK ».

3. Dans le gérant du protocole, créez un registre de plaque comme décrit dans le manuel de l'utilisateur de l'appareil. Dans la boîte de dialogue qui s'affiche, sélectionnez « GeneMapper—Generic » dans le menu déroulant « Application », puis sélectionnez le type de plaque approprié (96 puits). Ajoutez les données dans les fenêtres du propriétaire et de l'opérateur, puis sélectionnez « OK ».

   Remarque : si vous souhaitez effectuer une analyse automatique des données des échantillons, reportez-vous au manuel de l'utilisateur de l'appareil pour les instructions.

4. Dans les champs appropriés du registre de plaque GeneMapper®, saisissez les noms des échantillons. Faites défiler vers la droite. Dans la colonne des groupes de résultats 1, sélectionnez le groupe de résultats souhaité. Dans la colonne des protocoles 1 de l'appareil, sélectionnez le protocole que vous avez créé à l'étape 2. Assurez-vous que cette information est présente pour chaque rangée qui contient un nom d'échantillon. Sélectionnez « OK ».

   Remarque : pour créer un nouveau groupe de résultats, sélectionnez « New » (nouveau) dans le menu déroulant de la colonne des groupes de résultats. Sélectionnez l'onglet « Général » et saisissez un nom. Sélectionnez l'onglet « Analysis » (analyse) puis sélectionnez « GeneMapper—Generic » dans la liste déroulante du type d'analyse.

5. Placez les échantillons dans l'appareil et fermez les portes de l'appareil.

6. Dans « Spectral Viewer » (affichage spectral), confirmez que le jeu de marqueurs F est activé, puis réglez le calibrage actif approprié pour le jeu de marqueurs F.

7. Dans « run scheduler » (planificateur de la série), repérez le registre de plaque que vous venez de créer aux étapes 3 et 4, puis cliquez une seule fois sur son nom pour le mettre en surbrillance.

8. Une fois le registre de plaque mis en surbrillance, cliquez sur le schéma de plaque correspondant à la plaque sur l'échantillonneur automatique qui contient vos échantillons amplifiés.

9. Une fois que le registre de plaque est lié à la plaque, le schéma de plaque passe du jaune au vert, et la flèche verte « Run Instrument » (démarrer l'appareil) est activée.

10. Cliquez sur la flèche verte « Run Instrument » de la barre de menu pour démarrer l'analyse des échantillons.

11. Surveillez le progrès de l'électrophorèse en observant les fenêtres run (exécuter), view (visualiser), array (réseau) ou capillaries (capillaires) du logiciel de collecte des données. Chaque injection prendra environ 35 minutes.

5.B. Détection des fragments amplifiés à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100 avec logiciel de collecte des données, Version 1.0.1 ou 1.1

Matériel à fournir par l'utilisateur

- bloc chauffant, bain-marie ou thermocycleur réglé à 95 °C
- glace pilée ou bain d'eau glacée
- cônes de pipettes résistants aux aérosols
- centrifuge compatible avec les plaques à 96 puits
- réseau de capillaire 3100, 36 cm
- polymère à performance optimisée (POP-4™) pour le 3100
- tampon d'analyse génétique 10X avec EDTA
- plaque optique MicroAmp® à 96 puits et septums pour le 3100
- formamide Hi-Di™ (Applied Biosystems réf. 4311320)
- Standards de matrice PowerPlex®, 3100/3130 (réf. DG4650)

La qualité du formamide est d'importance critique. Utilisez du formamide Hi-Di™ ayant une conductivité de moins de 100 µS/cm. Congelez le formamide en aliquotes à –20 °C. Des cycles multiples de congélation-décongélation ou le stockage à long terme à 4 °C peuvent provoquer une dégradation du formamide. Si la conductivité du formamide est de plus de 100 µS/cm, il peut contenir des ions qui entrent en compétition avec l'ADN pendant l'injection, ce qui provoque des pics d'amplitude plus basse et une sensibilité réduite. Une durée d'injection prolongée peut ne pas augmenter le signal.

Attention : le formamide est un irritant et un tératogène. Évitez l'inhalation et le contact avec la peau. Lisez l'étiquette d'avertissement et prenez les précautions appropriées lors de la manipulation de cette substance. Portez toujours des gants et des lunettes protectrices pour le travail avec le formamide.

Préparation des échantillons

1. Préparez un cocktail de charge en combinant et en mélangeant le standard interne (Internal Lane Standard 600) et le formamide Hi-Di™ comme suit :

   [(0,5 µl ILS 600) × (nb. d'injections)] + [(9,5 µl formamide Hi-Di™) × (nb. d'injections)]

   Remarque : le volume de standard interne utilisé dans le cocktail de charge peut être augmenté ou réduit pour ajuster l'intensité des pics des standards de taille. La hauteur optimale des pics pour le fragment de 100 bases du standard interne est de 500 à 1000 RFU. Si les pics sont trop bas, nous vous recommandons de modifier le mélange de formamide/standards internes de façon à ce qu'il contienne 1,0 µl d'ILS 600 et 9,0 µl de formamide Hi-Di™. Si les pics sont trop hauts, nous vous recommandons de modifier le mélange de formamide/standards internes de façon à ce qu'il contienne 0,25 µl d'ILS 600 et 9,75 µl de formamide Hi-Di™.

2. Mélangez au vortex pendant 10 à 15 secondes.

3. Pipetez 10 µl du mélange de formamide/standard interne dans chaque puits.

4. Ajoutez 1 µl d'échantillon amplifié (ou 1 µl de mélange d'échelle allélique). Recouvrez les puits des septums adaptés.

   Remarques :

   1. Les limites de détection des appareils pouvant varier, il peut être nécessaire d'augmenter ou de réduire la durée de l'injection ou la quantité de produit mélangé au cocktail de charge. Utilisez le « Module Manager » (gérant du module) dans le menu des outils pour modifier la durée de l'injection ou le voltage dans le module d'exécution.
   2. Un précipité peut se former au cours de l'amplification. Ce précipité n'a pas d'effet sur les performances en aval de l'analyse ou de l'électrophorèse capillaire.

5. Centrifugez brièvement la plaque pour éliminer les bulles d'air des puits, si nécessaire.

6. Dénaturez les échantillons à 95 °C pendant 3 minutes, puis refroidissez immédiatement sur de la glace ou dans un bain d'eau glacée pendant 3 minutes. Dénaturez les échantillons juste avant de charger l'appareil.

Préparation de l'appareil

Reportez-vous au *manuel de l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100* pour obtenir les instructions concernant le nettoyage des blocs de pompes, l'installation du réseau de capillaires, l'exécution d'un calibrage spatial et le chargement de polymère dans la seringue de réserve.

1. Lancez le logiciel de collecte des données sur l'ABI PRISM® 3100.

2. Changez la durée d'exécution du module « GeneScan36_POP4DefaultModule » à 1200 secondes.

3. Changez le voltage d'injection à 3 kV.

4. Changez la durée de l'injection à 11 secondes.

   Remarque : la sensibilité peut varier selon les appareils. La durée et le voltage d'injection peuvent être ajustés dans le gérant du module. La plage suggérée de durée d'injection est de 3 à 22 secondes et celle du voltage d'injection est de 1 à 3 kV.

5. Enregistrez le module sous un nouveau nom (par ex., GeneScan36_POP4PowerPlexS5_3kV_11secs_1200). Utilisez celui-ci comme module initial pour toutes les exécutions.

6. Ouvrez un nouveau registre de plaque. Attribuez un nom à la plaque, puis sélectionnez « GeneScan ». Sélectionnez la taille de la plaque (96 puits). Sélectionnez « Finish » (terminer).

7. Remplissez le tableur du registre de plaque des puits que vous avez chargés. Saisissez les informations appropriées dans les colonnes du nom des échantillons et des infos. sur les marqueurs. Pour les échantillons d'échelle allélique, ajoutez le mot « ladder » (échelle) dans la colonne d'info des marqueurs bleu et vert. Cette information doit être saisie pour l'analyse correcte des données avec le macro PowerTyper™ S5.

8. Dans la colonne « BioLIMS Project », sélectionnez « 3100_Project1 » dans le menu déroulant.

9. Dans la colonne « Dye set » (jeu de marqueurs), sélectionnez « Z » dans le menu déroulant.

5.B. Détection des fragments amplifiés à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 3100 avec logiciel de collecte des données, Version 1.0.1 ou 1.1 (suite)

10. Si vous utilisez le logiciel de collecte de données version 1.0.1 ou 1.1 de l'ABI PRISM® 3100, sélectionnez « GeneScan36_POP4PowerPlexS5_3kV_11secs_1200 » dans le menu déroulant de la colonne Run Module 1.

11. Pour recueillir les données sans faire une analyse automatique, sélectionnez « No Selection » (pas de sélection) dans la colonne Analysis Module 1. Les paramètres de l'analyse peuvent être appliqués après la collecte des données et en cours d'analyse des données à l'aide du logiciel d'analyse GeneScan®.

12. Sélectionnez « OK ». Ce nouveau registre de plaque s'affichera dans le tableau des registres de plaque en attente, à la page de configuration de la plaque du logiciel de collecte de données.

13. Placez les échantillons dans l'appareil et fermez les portes de l'appareil.

14. Repérez le registre de plaque en attente que vous venez de créer, puis cliquez une seule fois sur son nom.

15. Une fois le registre de plaque mis en surbrillance, cliquez sur le schéma de plaque correspondant à la plaque sur l'échantillonneur automatique qui contient vos échantillons amplifiés afin de lier la plaque au registre de plaque.

16. Une fois que le registre de plaque est lié à la plaque, le schéma de plaque passe du jaune au vert, le registre de plaque passe du tableau des registres de plaque en attente au tableau des registre de plaque liées, et le bouton Run Instrument (démarrer l'appareil) est activé.

17. Cliquez sur le bouton Run Instrument de la barre de menu pour démarrer l'analyse des échantillons.

18. Surveillez le progrès de l'électrophorèse en observant les fenêtres run (exécuter), status (état), array (réseau) et capillaries (capillaires) du logiciel de collecte des données. Chaque injection prendra environ 35 minutes.

5.C. Détection des fragments amplifiés à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310

Matériel à fournir par l'utilisateur

- bloc chauffant, bain-marie ou thermocycleur réglé à 95 °C
- capillaires 310, 47 cm × 50 µm
- polymère à performance optimisée (POP-4™) pour le 310
- tampon d'analyse génétique 10X avec EDTA
- tubes à échantillons et septums
- cônes de pipettes résistants aux aérosols
- formamide Hi-Di™ (Applied Biosystems réf. 4311320)
- Standards de matrice PowerPlex®, 310 (réf. DG4640)
- glace pilée ou bain d'eau glacée

La qualité du formamide est d'importance critique. Utilisez du formamide Hi-Di™ ayant une conductivité de moins de 100 µS/cm. Congelez le formamide en aliquotes à –20 °C. Des cycles multiples de congélation-décongélation ou le stockage à long terme à 4 °C peuvent provoquer une dégradation du formamide. Si la conductivité du formamide est de plus de 100 µS/cm, il peut contenir des ions qui entrent en compétition avec l'ADN pendant l'injection, ce qui provoque des pics d'amplitude plus basse et une sensibilité réduite. Une durée d'injection prolongée peut ne pas augmenter le signal.

Attention : le formamide est un irritant et un tératogène. Évitez l'inhalation et le contact avec la peau. Lisez l'étiquette d'avertissement et prenez les précautions appropriées lors de la manipulation de cette substance. Portez toujours des gants et des lunettes protectrices pour le travail avec le formamide.

Préparation des échantillons

1. Préparez un cocktail de charge en combinant le standard interne (Internal Lane Standard 600) et le formamide Hi-Di™ comme suit :

   [(1,0 µl ILS 600) × (nb. d'injections)] + [(24,0 µl formamide Hi-Di™) × (nb. d'injections)]

   Remarque : le volume de standard interne utilisé dans le cocktail de charge peut être augmenté ou réduit pour ajuster l'intensité des pics des standards de taille. Si les pics sont trop bas, nous vous recommandons de modifier le mélange de formamide/standards internes de façon à ce qu'il contienne 0,5 µl d'ILS 600 et 24,5 µl de formamide Hi-Di™.

2. Mélangez au vortex pendant 10 à 15 secondes.

3. Combinez 25,0 µl du cocktail de charge préparé à 1,0 µl d'échantillon amplifié ou 1,0 µl de mélange d'échelle allélique PowerPlex® S5.

   Remarques :

   1. Les limites de détection des appareils pouvant varier, il peut être nécessaire d'augmenter ou de réduire la durée de l'injection ou la quantité de produit mélangé au cocktail de charge.
   2. Un précipité peut se former au cours de l'amplification. Ce précipité n'a pas d'effet sur les performances en aval de l'analyse ou de l'électrophorèse capillaire.

4. Dénaturez les échantillons et l'échelle en chauffant à 95 °C pendant 3 minutes, puis refroidissez immédiatement sur de la glace ou dans un bain d'eau glacée pendant 3 minutes. Dénaturez les échantillons juste avant de les charger.

5. Placez les tubes dans le plateau de l'échantillonneur automatique approprié (48 ou 96 tubes).

6. Placez le plateau de l'échantillonneur automatique dans l'appareil et fermez les portes de l'appareil.

5.C. Détection des fragments amplifiés à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310 (suite)

Préparation de l'appareil

Reportez-vous au *manuel de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310* pour obtenir les instructions concernant le nettoyage des blocs de pompes, l'installation des capillaires, le calibrage de l'échantillonneur automatique et le chargement de polymère dans la seringue.

1. Lancez le logiciel de collecte des données sur l'ABI PRISM® 310.

2. Préparez un tableur d'échantillons GeneScan® tel que décrit dans le *manuel de l'utilisateur de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310*. Saisissez les informations appropriées aux échantillons dans la colonne « sample info » (information sur les échantillons).

   Pour les rangées contenant l'échelle allélique PowerPlex® S5, ajoutez le mot « ladder » (échelle) dans la colonne d'info des marqueurs bleu et vert. Cette information doit être saisie pour l'analyse correcte des données avec le macro PowerTyper™ S5.

3. Créez une nouvelle liste d'injection GeneScan®. Sélectionnez le tableur d'échantillons appropriée à l'aide du menu déroulant.

4. Sélectionnez le module « GS STR POP4 (1ml) F » à l'aide du menu déroulant. Changez la durée d'injection à la valeur appropriée et la durée de l'exécution à 23 minutes. Réglez les paramètres restants comme indiqué ci-dessous :

Inj. Secs :	2–5
Inj. kV :	15,0
Run kV :	15,0 (kV au cours de l'exécution)
Run °C :	60 (temp. au cours de l'exécution)
Run Time :	23 (durée de l'exécution)

   Il est possible que vous deviez optimiser la durée de l'injection pour les appareils individuels. Nous recommandons une durée d'injection comprise entre 2 et 5 secondes.

   Remarque : la migration des fragments peut varier légèrement au cours d'une longue exécution sur l'analyseur génétique ABI PRISM® 310. Ce phénomène est vraisemblablement dû à des changements de températures ou de la colonne. Lors de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, il peut être utile d'injecter une échelle allélique plusieurs fois au cours de l'exécution pour faciliter le génotypage correct des échantillons.

5. Sélectionnez le fichier de matrice approprié (Section 3.B).

6. Pour analyser les données automatiquement, sélectionnez la case « auto analyze » ainsi que les paramètres d'analyse et standards de taille appropriés. Reportez-vous au *manuel de l'utilisateur de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310* pour obtenir des informations spécifiques concernant ces options.

7. Une fois le plateau des échantillons chargé et les portes fermées, sélectionnez « Run » (exécuter) pour démarrer le système d'électrophorèse capillaire (ÉC).

8. Surveillez le progrès de l'électrophorèse en observant les fenêtres des données brutes et de l'état. Pour chaque échantillon, cela prendra environ 35 minutes pour la mise en marche de la pompe de la seringue, l'injection de l'échantillon et l'électrophorèse.

6. Analyse des données

6.A. PowerPlex® Panel et Bin Sets avec GeneMapper® *ID*, Version 3.2

Pour faciliter l'analyse des données générées par le système PowerPlex® S5, nous avons créé des fichiers de panels et bins permettant l'attribution automatique des génotypes à l'aide du logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.2. Nous recommandons aux utilisateurs du logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.2 de suivre le *tutoriel des analyses d'identification humaine du logiciel GeneMapper®* ID *d'Applied Biosystems* pour apprendre l'utilisation correcte du logiciel. Nous recommandons aux utilisateurs du logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.1 de se mettre au niveau à la version 3.2.

Démarrage

1. Obtenez les fichiers de panels et bins appropriés à utiliser avec le logiciel GeneMapper® *ID* au site Web de Promega à l'adresse : **www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/**
2. Saisissez vos coordonnées, puis sélectionnez « GeneMapper ID version 3.2 ». Sélectionnez « Submit » (envoyer).
3. Sélectionnez le lien « PowerPlex® S5 Panels & Bin Sets », puis enregistrez le fichier .zip sur votre ordinateur.
4. Ouvrez les fichiers à l'aide du programme Windows® WinZip, puis enregistrez les fichiers décompressés à un emplacement connu de votre ordinateur.

Importation des fichiers panels et bins

Ces instructions suivent à peu près celles du tutoriel du logiciel Applied Biosystems GeneMapper® *ID*, pages 1–4.

1. Chargez le logiciel d'analyse GeneMapper® *ID*, version 3.2.
2. Sélectionnez « Tools » (outils), puis « Panel Manager » (gérant des panels).
3. Mettez en surbrillance l'icône du Panel Manager dans la fenêtre supérieure gauche (volet de navigation).
4. Sélectionnez « File » (fichier), puis « Import Panels » (importer les panels).
5. Accédez aux fichiers panel et bin enregistrés. Sélectionnez « PowerPlex_S5_Panels_ID3.2x.txt ».
6. Dans le volet de navigation, mettez en surbrillance le dossier PowerPlex_S5_Panels que vous venez d'importer.
7. Sélectionnez « File » (fichier), puis « Import Bin sets » (importer les bin sets).
8. Accédez aux fichiers panel et bin enregistrés. Sélectionnez « PowerPlex_S5_Bins_ID3.2x.txt », puis « Import » (importer).
9. Au bas de la fenêtre du gérant des panels, sélectionnez « Apply » (appliquer) puis « OK ». La fenêtre du gérant des panels se fermera automatiquement.

6.B. Création d'une méthode d'analyse à l'aide du logiciel GeneMapper® *ID*

Ces instructions suivent à peu près celles du tutoriel du logiciel Applied Biosystems GeneMapper® *ID*, pages 1-11.

1. Sélectionnez « Tools » (outils), puis « GeneMapper Manager » (gérant de GeneMapper).
2. Sélectionnez l'onglet de la méthode d'analyse.
3. Sélectionnez « New » (nouveau) – une nouvelle boîte de dialogue de méthode d'analyse s'affichera.
4. Sélectionnez « HID » puis « OK ».

   Remarque : si l'option HID n'est pas affichée, vous n'avez pas le logiciel GeneMapper® *ID*. Contactez Applied Biosystems.
5. Saisissez un nom descriptif pour la méthode d'analyse, par ex. « PowerPlexS5 advanced ».
6. Sélectionnez l'onglet Allèle (Figure 2).
7. Sélectionnez le bin set correspondant au Système PowerPlex® « PowerPlex_S5_Bin_ID3.2x ».
8. Assurez-vous que la case « Use marker-specific stutter ratio if available » (Utiliser le taux de bégayement spécifique au marqueur si disponible) est cochée.

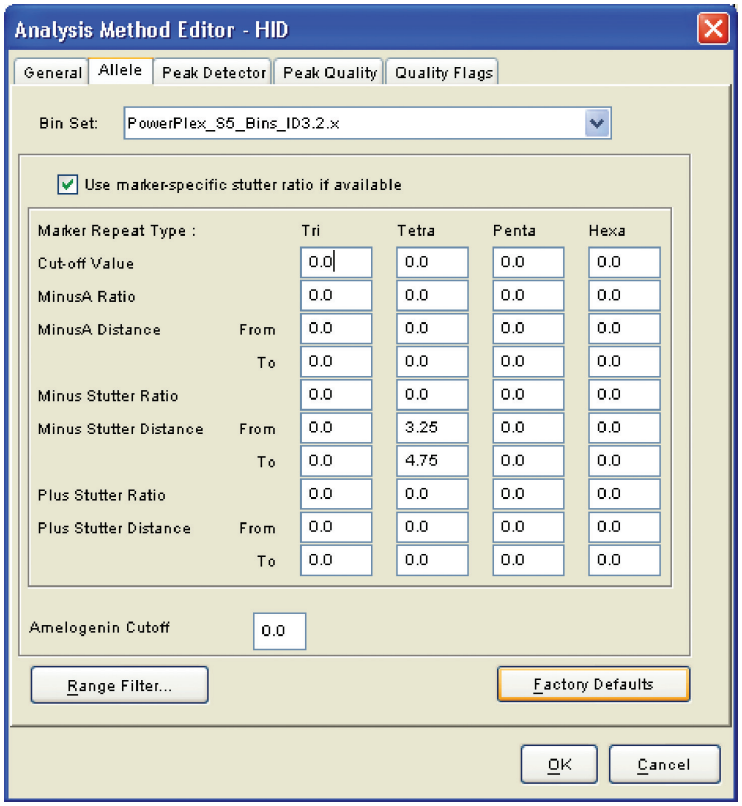

Figure 2. L'onglet Allèle. Sélectionnez le bin set « PowerPlex_S5_Bins_ID3.2x ».

9. Saisissez les valeurs indiquées à la Figure 2 pour filtrer correctement les pics de bégayement lorsque les systèmes PowerPlex® sont utilisés. Pour une explication de l'utilisation correcte de ces paramètres et de leurs effets, reportez-vous au bulletin de l'utilisateur d'Applied Biosystems intitulé « *Installation Procedures and New Features for GeneMapper* ID *Software 3.2* » (Procédures d'installation et nouvelles fonctionnalités du logiciel GeneMapper ID 3.2) ainsi qu'au *guide de l'utilisateur du logiciel d'analyse d'identification humaine GeneMapper® ID Version 3.1*.

   Remarque : certains de ces paramètres ont été optimisés et sont différents des paramètres recommandés dans le bulletin de l'utilisateur.

10. Sélectionnez l'onglet « Peak Detector » (détecteur de pics). Nous recommandons l'utilisation des paramètres indiqués à la Figure 3.

    Remarque : pour la plage d'analyse, sélectionnez « full range » (plage entière) ou « partial range » (plage partielle). Si vous utilisez une plage partielle, choisissez une plage d'analyse appropriée en fonction des données. Choisissez un point de départ après le pic des amorces et juste avant le premier pic défini du standard interne pour faciliter la détermination de la taille du standard interne.

11. Sélectionnez l'onglet Peak Quality (qualité des pics). Vous pouvez modifier les paramètres de qualité des pics.

    Remarque : pour les étapes 11 et 12, reportez-vous au manuel de l'utilisateur du GeneMapper® *ID* pour plus d'informations.

12. Sélectionnez l'onglet Quality Flags (Signalement de la qualité). Vous pouvez également modifier ces paramètres.

13. Sélectionnez « OK » pour enregistrer vos paramètres.

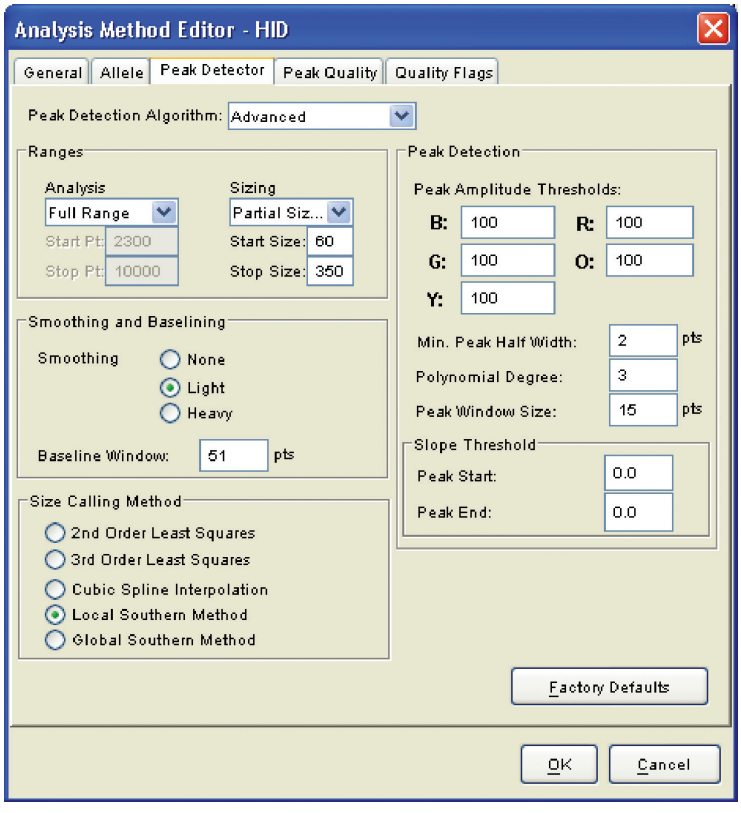

Figure 3. L'onglet Détecteur de pics.

6.B. Création d'une méthode d'analyse à l'aide du logiciel GeneMapper® *ID* (suite)

Création d'un standard de taille

1. Sélectionnez « Tools » (outils), puis « GeneMapper Manager » (gérant de GeneMapper).
2. Sélectionnez l'onglet « Size Standard » (standard de taille).
3. Sélectionnez « New » (nouveau).
4. Sélectionnez « Basic or Advanced » (de base ou avancé) (Figure 4). La méthode d'analyse sélectionnée doit correspondre à celle créée plus haut. Sélectionnez « OK ».
5. Dans la fenêtre « Size Standard Editor » (Éditeur des standards de taille), saisissez un nom descriptif, par ex. « 60–350 ILS Adv » (Figure 5).
6. Pour la couleur du marqueur de standard de taille (Size standard dye), choisissez le rouge (red).
7. Saisissez les tailles des fragments du standard interne compris entre 60 et 350 pb (Section 9.C, Figure 11).

   Remarque : avec les durées d'exécution recommandées dans ce manuel, tous les fragments du standard interne ILS 600 ne seront pas détectés. Marquez tous les fragments présents. Pour une détermination précise de la taille, le fragment de 350 pb doit être détecté. Si celui-ci est présent, des fragments de plus grande taille peuvent également être marqués.
8. Sélectionnez « OK ».

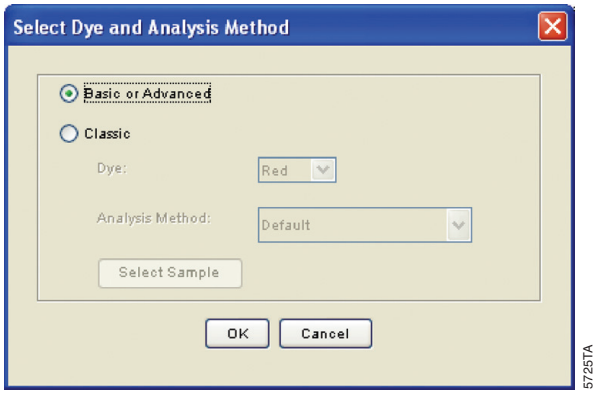

Figure 4. La fenêtre de sélection du marqueur et de la méthode d'analyse.

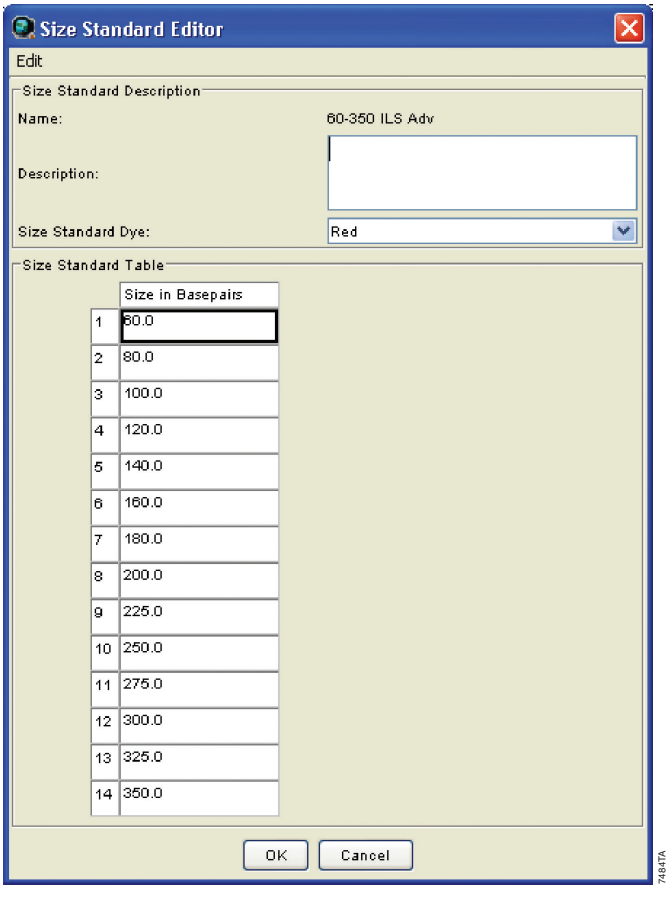

Figure 5. L'éditeur des standards de taille.

Traitement des données des échantillons

1. Importez les fichiers d'échantillons dans un nouveau projet tel que décrit dans le *tutoriel des analyses d'identification humaine du logiciel GeneMapper®* ID *d'Applied Biosystems*.

2. Dans le menu déroulant de la colonne Sample Type (type d'échantillon), sélectionnez « Ladder » (échelle), « Sample » (échantillon) ou « Negative Control » (contrôle négatif). Chaque dossier du projet doit contenir au moins une échelle indiquée en tant que telle pour permettre un génotypage correct.

3. Dans la colonne Analysis Method, sélectionnez la méthode d'analyse créée plus haut.

4. Dans la colonne Panel, sélectionnez « PowerPlex_S5_Panels ». Il s'agit du panel set que vous avez importé à la Section 6.A.

5. Dans la colonne Size Standard, sélectionnez le standard de taille créé à la section « Création d'un standard de taille ».

6. Si vous analysez des données provenant d'un analyseur génétique ABI PRISM® 310, assurez-vous que le fichier de matrice approprié est bien sélectionné dans la colonne « Matrix ».

7. Sélectionnez « Analyze » (analyser, bouton en flèche verte) pour démarrer l'analyse des données.

6.C. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel GeneScan® et des systèmes d'exploitation PC

1. Analyse des données à l'aide du logiciel d'analyse GeneScan®.
2. Examinez les données brutes d'une ou de plusieurs série(s) d'échantillons. Mettez en surbrillance le nom du fichier de l'échantillon, puis sélectionnez « raw data » (données brutes) dans le menu « Sample » (échantillon). Déplacez le curseur de façon à ce que le réticule soit sur la ligne de base à droite du grand pic des amorces (avant le premier pic [rouge] des standards internes). Utilisez les coordonnées de l'abscisse (valeur X) affichées dans le coin inférieur gauche de la fenêtre comme position de départ dans les paramètres d'analyse.
3. Les paramètres d'analyse recommandés sont indiqués dans la Figure 6.
4. Les paramètres d'analyse peuvent être enregistrés dans le dossier Params, qui se trouve dans la plupart des ordinateurs sous : C:\AppliedBio\Shared\Analysis\Sizecaller\Params\
5. Appliquez le fichier des paramètres d'analyse enregistrés aux échantillons.

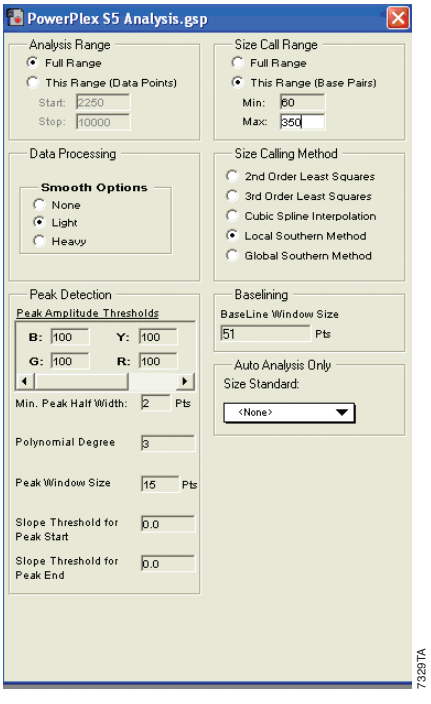

Figure 6. la fenêtre des paramètres de l'analyse. Le point de départ de la plage d'analyse, qui peut varier, est défini à la Section 6.C ou 6.D, étape 2.

6. Attribuez un nouveau standard de taille. Sélectionnez un fichier d'échantillons, puis mettez en surbrillance la flèche à côté du standard de taille. Sélectionnez « define new » (définir nouveau). Attribuez les pics des standards de taille tel qu'indiqué dans la Figure 11 de la Section 9.C. Stockez les standards de taille dans le dossier « Size Standards », sous : C:\AppliedBio\Shared\Analysis\Sizecaller\SizeStandards\

   Remarque : avec les durées d'exécution recommandées dans ce manuel, tous les fragments du standard interne ILS 600 ne seront pas détectés. Marquez tous les fragments présents. Pour une détermination précise de la taille, le fragment de 350 pb doit être détecté. Si celui-ci est présent, des fragments de plus grande taille peuvent également être marqués.

7. Appliquez le fichier de standards de taille aux échantillons, puis analysez les fichiers des échantillons. Reportez-vous à la Section 6.E pour plus d'informations sur l'utilisation du Macro PowerTyper™ S5 et du logiciel Genotyper®.

   Pour des renseignements complémentaires sur le logiciel d'analyse GeneScan®, reportez-vous au *guide de l'utilisateur du logiciel GeneScan®* .

6.D. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel GeneScan® et des systèmes d'exploitation Macintosh®

1. Analysez les données à l'aide du logiciel d'analyse GeneScan®.

2. Examinez les données brutes d'une ou de plusieurs série(s) d'échantillons. Mettez en surbrillance le nom du fichier de l'échantillon, puis sélectionnez « raw data » (données brutes) dans le menu Sample (échantillon). Déplacez le curseur de façon à ce que le réticule soit sur la ligne de base à droite du grand pic des amorces (avant le premier pic [rouge] des standards internes). Utilisez les coordonnées de l'abscisse (valeur X) affichées dans le coin inférieur gauche de la fenêtre comme position de départ dans les paramètres d'analyse.

3. Les paramètres d'analyse recommandés sont les suivants :

Analysis Range (plage d'analyse)	Start (début) : Défini à l'étape 2 Stop : 10 000
Data Processing (traitement des données)	Baseline (ligne de base) : Case cochée Multicomponent (multicomposant) : Case cochée Smooth Options (lissage) : Light (léger)[1]
Peak Detection (détection des pics)	Peak Amplitude Thresholds (seuils des amplitudes de pics)[2] : B : Y : G : R : Min. Peak Half Width (largeur min. demi pics) : 2 pts
Size Call Range (plage de tailles attribuées)	Min : 60 Max : 350
Size Calling Method (méthode d'attribution de la taille)	Local Southern Method
Split Peak Correction (correction des pics doubles)	None (aucune)

[1]Les options de lissage doivent être optimisées dans les laboratoires individuels.

[2]Les seuils des amplitudes de pics sont les hauteurs minimales des pics que le logiciel considèrera comme un pic. Les valeurs des seuils des amplitudes de pics sont généralement comprises entre 50 et 200 RFU et doivent être déterminées dans chaque laboratoire individuel.

6.D. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel GeneScan® et des systèmes d'exploitation Macintosh® (suite)

4. Les paramètres d'analyse peuvent être enregistrés dans le dossier Params.

5. Appliquez le fichier des paramètres d'analyse enregistrés aux échantillons.

6. Attribuez un nouveau standard de taille. Sélectionnez un fichier d'échantillons, puis mettez en surbrillance la flèche à côté du standard de taille et sélectionnez « define new » (définir nouveau). Attribuez les pics des standards de taille tel qu'indiqué dans la Figure 11 de la Section 9.C. Stockez les standards de taille dans le dossier Size Standards.

   Remarque : avec les durées d'exécution recommandées dans ce manuel, tous les fragments du standard interne ILS 600 ne seront pas détectés. Marquez tous les fragments présents. Pour une détermination précise de la taille, le fragment de 350 pb doit être détecté. Si celui-ci est présent, des fragments de plus grande taille peuvent également être marqués.

7. Appliquez le fichier de standards de taille aux échantillons, puis analysez les fichiers des échantillons. Reportez-vous à la Section 6.E pour plus d'informations sur l'utilisation du Macro PowerTyper™ S5 et du logiciel Genotyper®.

   Pour des renseignements complémentaires sur le logiciel d'analyse GeneScan®, reportez-vous au *guide de l'utilisateur du logiciel GeneScan®* .

6.E. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel Genotyper® et du Macro PowerTyper™ S5

Pour faciliter l'analyse des données générées par le système PowerPlex® S5, nous avons créé un fichier permettant l'attribution automatique des génotypes à l'aide du logiciel Genotyper®. Après l'amplification des échantillons, leur détection à l'aide de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310 ou 3100 (à l'aide du logiciel de collecte des données, version 1.0.1 ou 1.1) et leur analyse à l'aide du logiciel GeneScan®, les fichiers d'échantillons peuvent être importés dans le programme Genotyper® et analysés à l'aide du Macro PowerTyper™ S5.

Le macro PowerTyper™ peut être téléchargé à partir du site Web de Promega à l'adresse : **www.promega.com/geneticidtools/**

Le Macro PowerTyper™ S5 est utilisé en association avec le logiciel Macintosh® Genotyper®, version 2.5, et le logiciel Windows NT® Genotyper®, version 3.6 ou ultérieure. Le logiciel Genotyper® doit être installé dans votre ordinateur avant de pouvoir utiliser le Macro PowerTyper™.

Assurez-vous que la colonne « sample info » (info des échantillons, sur ordinateurs Macintosh®) ou la colonne « color info » (info des couleurs, sur systèmes d'exploitation Windows NT®) porte bien le mot « ladder » (échelle). Le macro utilise le mot « ladder » pour identifier le ou les fichier(s) d'échantillons contenant l'échelle allélique. Il est possible d'ajouter ou de modifier l'info des échantillons après leur importation dans le macro PowerTyper™. Mettez un échantillon en surbrillance, puis sélectionnez « show dye/lanes window » (afficher la fenêtre marqueur/pistes) dans le menu « Views » (affichages).

1. Téléchargez le macro PowerTyper™ S5 à partir du site Web de Promega.

2. Lancez le logiciel Genotyper®, puis le macro PowerTyper™ S5. Pour toute question sur le logiciel Genotyper®, reportez-vous au *guide de l'utilisateur du logiciel d'analyse Genotyper®*.

3. Dans le menu File (fichier), sélectionnez « Import » (importer) et importez les fichiers de projet ou d'échantillons GeneScan® à analyser. Importez les couleurs des marqueurs bleu, vert et rouge (blue, green, red).

   Remarque : pour sélectionner les couleurs des marqueurs à importer, sélectionnez « Set Preferences » dans le menu « Edit ».

4. Double-cliquez sur le macro Check ILS. Les macros sont indiqués au coin inférieur gauche de la fenêtre active. Une fenêtre de graphiques s'affichera, où le standard interne (internal lane standard ILS 600) apparaîtra en rouge. Faites défiler vers le bas pour visualiser et confirmer que les tailles des fragments du standard interne sont correctes. Si nécessaire, définissez à nouveau les fragments du standard interne et réanalysez les échantillon à l'aide du logiciel GeneScan®.

   Remarque : le logiciel utilise un seul échantillon d'échelle pour déterminer la taille des allèles. Le macro utilise le premier échantillon d'échelle importé pour l'attribution des allèles.

5. Double-cliquez sur le macro POWER. Le macro POWER identifie les allèles de l'échelle et calcule les décalages (offsets) de tous les locus. Ce processus peut prendre quelques minutes. Une fois terminé, une fenêtre de graphiques s'ouvrira, affichant les échelles alléliques (par ex. D8S1179, D18S51, Amélogénine, etc.).

   En général, les échelles alléliques contiennent des fragments de taille correspondant à de nombreux allèles du locus. Les tailles de l'échelle allélique et les unités répétées sont indiquées au Tableau 3 (Section 9.A). L'analyse à l'aide des logiciels GeneScan® et Genotyper® permet la détermination des allèles en comparant les fragments des échantillons amplifiés avec les échelles alléliques et les standards internes. Lorsqu'un standard interne est utilisé, les tailles calculées des composants de l'échelle allélique peuvent être différentes de celles indiquées dans le tableau. Ceci est dû aux différences de migration en raison des différences de séquences entre les fragments de l'échelle allélique et des fragments du standard interne, et ne doit pas soulever d'inquiétudes.

6. Double-cliquez sur le macro « Allelic Ladders » (échelles alléliques). Une fenêtre de graphiques s'ouvrira, affichant les échelles alléliques bleues (fluorescéine, à savoir Amélogénine, D18S51 et D8S1179) et les échelles alléliques bleues (JOE, à savoir TH01). Confirmez que les attributions des allèles de l'échelle allélique ont été effectuées correctement (Figure 8 dans la Section 6.G).

   Remarque : le logiciel utilise un seul échantillon d'échelle pour déterminer la taille des allèles. Le macro utilise le premier échantillon d'échelle importé pour l'attribution des allèles. Si le macro POWER est exécuté une deuxième fois, le logiciel utilisera la deuxième échelle ; si le macro POWER est exécuté une troisième fois, le logiciel utilisera la troisième échelle, etc., jusqu'à ce que toutes les échelles du projet soient utilisées. Si une échelle allélique n'est pas analysée ou si de nombreux allèles en dehors de l'échelle sont identifiés dans les échantillons, ceux-ci doivent être réanalysés à l'aide d'une autre échelle du projet.

7. Double-cliquez sur le macro « Display Fluorescein Data » (afficher les données de fluorescéine) pour afficher le marqueur bleu de toutes les injections d'échantillons/pistes. Faites défiler vers le bas pour visualiser, et modifiez au besoin.

8. Double-cliquez sur le macro « Display JOE Data » (afficher les données de JOE) pour afficher le marqueur vert de toutes les injections d'échantillons/pistes. Faites défiler vers le bas pour visualiser, et modifiez au besoin.

6.E. Analyse des échantillons à l'aide du logiciel Genotyper® et du Macro PowerTyper™ S5 (suite)

9. Créez le tableau approprié en sélectionnant le macro « PowerTable » (tableau complet), « Make Allele Table » (faire un tableau des allèles) ou « Make Vertical Table » (faire un tableau vertical). Les trois formats de tableaux sont illustrés ci-dessous. L'option PowerTable permet d'afficher jusqu'à quatre allèles par fichier d'échantillons. Des informations supplémentaires, comme le signal du pic bas ou du pic élevé, sont aussi inclues. Les options « Allele Table » et « Vertical Table » ne comprennent que deux allèles par locus. Si plus de deux allèles sont présents dans un locus, les allèles identifiés les plus petits sont inclus. Le format « Allele Table » affiche les catégories (locus) en colonnes, alors que le format « Vertical table » affiche les catégories en rangées. Ces tableaux peuvent être personnalisés pour s'adapter aux besoins. Pour enregistrer les données des tableaux, mettez en surbrillance « Export to File... » (exporter vers fichier) dans le menu déroulant Table, puis enregistrez le tableau au nom et à l'emplacement voulu. Le fichier enregistré peut être visualisé et analysé dans Microsoft® Excel.

Format PowerTable

Info échant.	Commentaire échant.	Catégorie	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4	Over-flow	Faible Signal	Satura-tion	Annot. modifiée	Rangée modifiée

Format Allele Table

Info échant.	Catégorie Allèle 1	Catégorie Allèle 2	Catégorie Allèle 1	Catégorie Allèle 2	Catégorie Allèle 1	Catégorie Allèle 2	Catégorie Allèle 1	Catégorie Allèle 2

Format Vertical Table

Info échant.	Catégorie	Pic 1	Pic 2

10. Pour enregistrer les données analysées, allez au menu File (fichier) et sélectionnez « Save as » (enregistrer sous).

Le macro PowerTyper™ est un fichier de Genotyper® et peut être remplacé par erreur si « Save » (enregistrer) est utilisé au lieu de « Save as » (enregistrer sous).

6.F. Contrôles

1. Examinez les résultats du contrôle négatif. Le contrôle négatif ne doit présenter aucun produit d'amplification.

2. Examinez les résultats de la réaction du contrôle positif d'ADN 2800M. Comparez les tailles des répétitions alléliques de l'ADN de contrôle avec l'échelle allélique spécifique du locus. Les attributions attendues des allèles de l'ADN 2800M sont indiquées au Tableau 4 (Section 9.A).

6.G. Résultats

Des résultats représentatifs du système PowerPlex® S5 sont présentés dans la Figure 7.

Le mélange d'échelle allélique PowerPlex® S5 est présenté dans la Figure 8.

Artéfacts et bégayement

Les bandes de bégayement sont des artéfacts courants d'amplification associés à l'analyse des STR. Les produits du bégayement s'observent souvent à une distance d'une unité répétée en dessous du vrai pic de l'allèle, et parfois de deux unités en dessous ou d'une unité au dessus du vrai pic de l'allèle. Les allèles ayant un nombre plus élevé d'unités répétées ont tendance à présenter un pourcentage plus élevé de bégayement. La présentation et l'intensité du bégayement peuvent être légèrement différentes d'un jeu d'amorces à l'autre pour le même locus.

En outre, d'autres pics d'artéfacts peuvent s'observer dans certains des locus du système PowerPlex® S5. Des produits à faible intensité peuvent être présents aux positions n–2 et n+2 (deux bases en dessous et au dessus du vrai pic de l'allèle, respectivement) de certains locus, tels que D18S51.

Un ou plusieurs pics supplémentaires qui ne sont pas directement liés à l'amplification peuvent s'observer à une position plus petite de 11 bases pour les allèles TH01, de 1 base pour les allèles FGA et de 1 ou 8 bases pour les allèles d'amélogénine. Ces pics supplémentaires peuvent se produire en cas de pics amplifiés particulièrement intenses (signal élevé ou grande quantité de matrice), de formamide, polymère ou capillaire de mauvaise qualité, ou de dénaturation inefficace. Un ou plusieurs pics supplémentaires qui ne sont pas directement liés à l'amplification peuvent s'observer à 73 pb dans le canal de fluorescéine et à 72–76 pb dans le canal de JOE. Reportez-vous à la Section 7 pour plus d'informations sur la manière de minimiser ces artéfacts.

Si désiré, les filtres de bégayement peuvent être modifiés dans les panel et bin sets de PowerPlex® pour le logiciel GeneMapper® *ID*e, version 3.2, ou le macro PowerTyper™. Veuillez contacter le service technique de Promega (**genetic@promega.com**) pour assistance au sujet de ces modifications.

Remarques :

1. Des hauteurs de pics en dehors de la plage linéaire de l'appareil peuvent créer des pics d'artéfacts provoqués par une saturation de l'appareil (surcharge de l'échantillon). Il est possible que des bavures (pics d'interférence) d'une couleur à l'autre soient visibles. Des signaux saturés peuvent également apparaître sous forme de deux pics (pics doubles).
2. Si la hauteur des pics ne se situe pas dans la plage de détection linéaire de l'appareil, le taux de pics de bégayement par rapport aux vrais pics augmente, et l'attribution des allèles peut être difficile à interpréter. L'équilibre des hauteurs de pics peut également être moins uniforme.

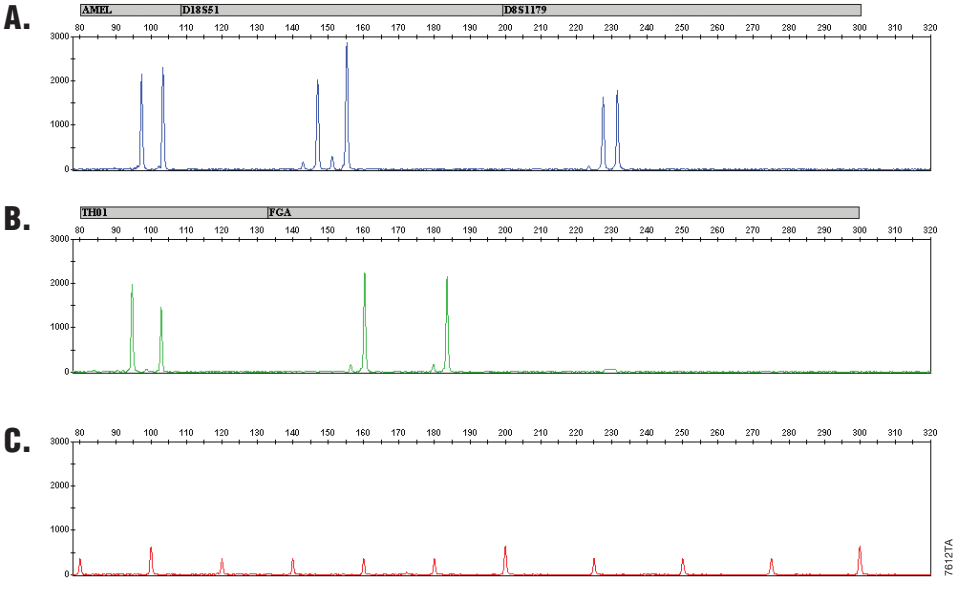

Figure 7. Le système PowerPlex® S5. Un seul ADN matrice (250 pg) a été amplifié à l'aide du système PowerPlex® S5. Les produits de l'amplification ont été détectés à l'aide d'un analyseur génétique Applied Biosystems 3130*xl* avec une injection de 5 secondes à 3 kV. Les résultats ont été analysés avec le logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.2. **Panel A.** Un électrophérogramme des pics des locus marqués à la fluorescéine : Amélogénine, D18S51 et D8S1179. **Panel B.** Un électrophérogramme des pics des locus marqués à la JOE : TH01 et FGA. **Panel C.** Un électrophérogramme des fragments du standard interne 600 compris entre 80 et 300 pb.

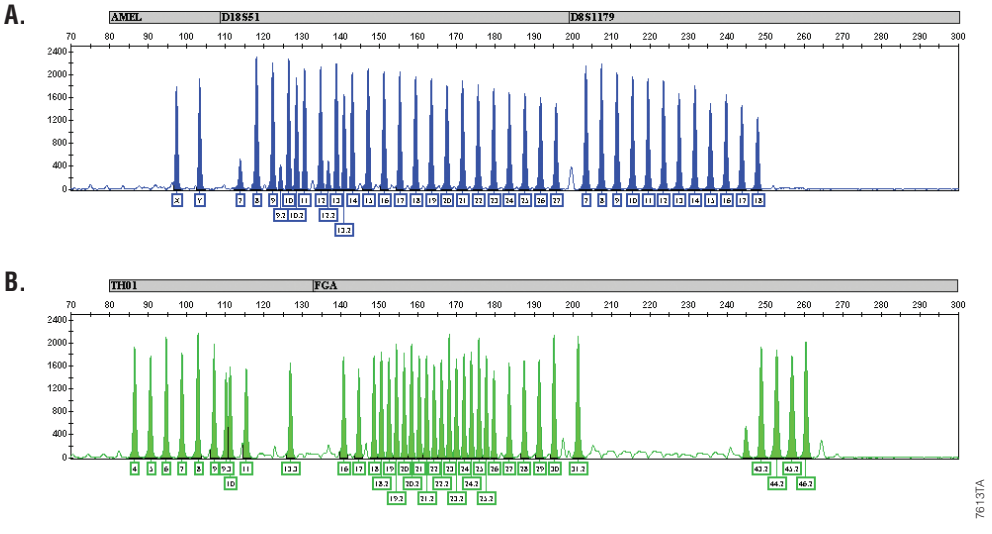

Figure 8. Le mélange d'échelle allélique du système PowerPlex® S5. Le mélange d'échelle allélique du système PowerPlex® S5 a été analysé à l'aide d'un analyseur génétique Applied Biosystems 3130*xl* avec une injection de 5 secondes à 3 kV. Les résultats ont été analysés avec le logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.2. **Panel A.** Les composants de l'échelle allélique marqués à la fluorescéine. **Panel B.** Les composants de l'échelle allélique marqués à la JOE.

7. Dépannage

Pour toute question qui ne serait pas traitée ci-dessous, veuillez consulter une succursale ou un distributeur Promega local. Les coordonnées de ceux-ci sont disponibles au site : www.promega.com. Adresse électronique : **genetic@promega.com**

7.A. Amplification et détection des fragments

Symptômes	Causes et commentaires
Pics d'allèles estompés ou absents	ADN matrice impur. En raison de la faible quantité de matrice utilisée, ce problème se pose rarement. Selon la procédure d'extraction de l'ADN utilisée et la source de l'échantillon, des inhibiteurs peuvent être présents dans l'échantillon d'ADN.
	ADN matrice insuffisant. Utiliser la quantité recommandée d'ADN matrice, augmenter la durée ou le voltage d'injection, augmenter le nombre de cycles ou le volume de l'échantillon amplifié au cours de la préparation des échantillons.
	Activité insuffisant de l'enzyme. Utiliser la quantité recommandée de PowerPlex® S5 5X Master Mix, et mélanger le Master Mix 5X au vortex avant l'emploi.
	Programme d'amplification incorrect. Vérifier le programme d'amplification.
	Mélange d'amplification PCR pas mélangé à fond. Mélanger au vortex pendant 5–10 secondes avant de le placer dans les tubes ou plaques de réaction.
	Poche d'air formée au fond du puits. Utiliser une pipette pour éliminer la poche d'air, ou centrifuger brièvement avant le cycle thermique. Centrifuger les échantillons avant de les injecter dans l'appareil d'ÉC.
	Concentration élevée en sels ou pH altéré. Si l'ADN matrice est stocké dans du tampon TE qui n'est pas au pH 8,0 ou qui contient une concentration plus élevée en EDTA, le volume de l'ADN ne doit pas dépasser 20 % du volume total de la réaction. Les résidus de K^+, Na^+, Mg^{2+} ou d'EDTA provenant de l'ADN peuvent avoir un impact négatif sur la PCR. Un changement de pH peut également inhiber la PCR. Stocker l'ADN dans du tampon TE^{-4} (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1 mM EDTA) ou de l'eau sans nucléase.
	Problèmes du thermocycleur, de la plaque ou des tubes. Consulter les protocoles du cycle thermique à la Section 4.B. Nous n'avons pas testé d'autres tubes ou plaques de réaction ou thermocycleurs. Cali-brer le bloc chauffant du thermocycleur, si nécessaire.
	Concentration des amorces trop basse. Utiliser la concentration d'amorces recommandée. Mélanger le mélange d'amorces PowerPlex® S5 10X Primer Pair au vortex pendant 15 secondes avant l'emploi.
	Échantillons pas entièrement dénaturés. Dénaturer les échantillons à la chaleur pendant la durée recommandée, puis refroidir sur de la glace ou dans un bain d'eau glacée immédiatement avant l'ÉC.
	Mauvaise injection d'ÉC (pics ILS 600 également touchés). Réinjecter l'échantillon. Vérifier si la seringue fuit. Vérifier si le laser est sous tension.
	Utilisation de formamide de mauvaise qualité. N'utiliser que du formamide Hi-Di™ lors de l'analyse des échantillons.

7.A. Amplification et détection des fragments (suite)

Symptômes	Causes et commentaires
Pics supplémentaires visibles dans un ou dans tous les canaux de couleurs	Contamination avec un autre ADN matrice ou de l'ADN préalablement amplifié. La contamination croisée peut poser des problèmes. Utiliser des cônes de pipettes résistants aux aérosols et changer souvent de gants.
	Échantillons pas entièrement dénaturés. Dénaturer les échantillons à la chaleur pendant la durée recommandée, puis refroidir sur de la glace ou dans un bain d'eau glacée immédiatement avant l'ÉC.
	Artéfacts de l'amplification des STR. L'amplification des systèmes de STR par PCR peut provoquer des artéfacts sous forme de pics de taille plus petite d'une base par rapport à l'allèle en raison de l'ajout incomplet du résidu A en 3'. S'assurer d'effectuer l'étape d'élongation de 45 minutes à 60 °C après le cycle thermique (Section 4.B).
	Bruit de fond élevé. Diminuer la durée de l'injection. Voir la Section 5.
	Artéfacts liés à l'ÉC (« pointes »). Des petites variations de voltage ou des cristaux d'urée passant dans le rayon du laser peuvent provoquer des « pointes » ou pics inattendus. Les pointes s'observent parfois dans une seule couleur, mais sont souvent identifiées facilement par leur présence dans plus d'une couleur. Réinjecter les échantillons pour confirmer.
	Artéfacts liés à l'ÉC (contaminants). Les contaminants dans l'eau utilisée dans l'appareil ou pour diluer le tampon de l'analyseur génétique 10X peuvent provoquer des pics dans les canaux bleu et vert. Utiliser de l'eau stérilisée en autoclave, changer les flacons et le réservoir de tampon de lavage.
	Quantité excessive d'ADN. L'amplification de > 1 ng de matrice peut engendrer un grand nombre de bandes de bégayement et d'autres artéfacts.
	Pics d'interférence ou bavures. Des pics d'interférence peuvent se produire lorsque la hauteur des pics est trop élevée ou si une matrice incorrecte ou de mauvaise qualité a été ajoutée aux échantillons. • Dans le cas de l'analyseur génétique ABI PRISM® 310, créer une nouvelle matrice, puis l'appliquer aux échantillons. Dans le cas des analyseurs génétiques ABI PRISM® 3100 et 3100-*Avant* ou Applied Biosystems 3130 et 3130*xl*, effectuer un nouveau calibrage spectral et réinjecter les échantillons. • La sensibilité peut varier selon les appareils. Optimiser les conditions d'injection. Voir la Section 5.
	Le stockage à long terme des échantillons amplifiés dans le formamide peut entraîner leur dégradation. Répéter la préparation des échantillons avec du nouveau formamide.
	Le polymère d'ÉC a dépassé sa date d'expiration ou a été stocké à température ambiante pendant plus d'une semaine.
	Effectuer un entretien des appareils quotidiennement ou hebdomadairement, tel que recommandé par le fabricant.
	Mélange d'amplification par PCR pas mélangé à fond. Mélanger au vortex pendant 5–10 secondes avant de le placer dans les tubes ou plaques de réaction.
	Poche d'air formée au fond du puits. Utiliser une pipette pour éliminer la poche d'air, ou centrifuger brièvement avant le cycle thermique.
Précipité observé dans les échantillons après l'amplification.	Un précipité peut se former suite à la dénaturation thermique de la protéine utilisée pour le démarrage à chaud. Ce précipité n'a pas d'effet sur les performances en aval de l'amplification ou de l'électrophorèse capillaire.

Symptômes	Causes et commentaires
Migration de l'échelle allélique différente de celle de l'échantillon	L'échelle allélique et le mélange de paires d'amorces n'étaient pas compatibles. S'assurer que l'échelle allélique provient du même système que le mélange de paires d'amorces.
	Formamide de mauvaise qualité. N'utiliser que du formamide Hi-Di™ lors de l'analyse des échantillons.
	Migration des échantillons légèrement changée au cours d'une série d'ÉC comportant de nombreux échantillons. Ceci peut être dû à des changements de températures ou de la colonne d'ÉC au fil du temps. Utiliser une injection différente de l'échelle allélique pour la détermination des tailles.
Déséquilibres de la hauteur des pics	ADN matrice insuffisant. Utiliser la quantité recommandée d'ADN matrice. Des effets stochastiques peuvent se produire lorsque des faibles quantités de matrice sont amplifiés.
	Problèmes divers d'équilibre. Décongeler le mélange de paires d'amorces 10X et le Master Mix 5X complètement, puis passer au vortex pendant 5–10 secondes avant l'emploi. Ne pas centrifuger le mélange de paires d'amorces 10X après l'avoir mélangé. Calibrer les thermocycleurs et pipettes régulièrement.
	ADN matrice impur. Des inhibiteurs potentiellement présents dans les échantillons de médecine légale peuvent provoquer une perte ou un déséquilibre d'allèles.
	Mélange d'amplification par PCR pas mélangé à fond. Mélanger au vortex pendant 5–10 secondes avant de le placer dans les tubes ou plaques de réaction.

7.B. Logiciel d'analyse GeneMapper® *ID*

Symptômes	Causes et commentaires
Allèles non déterminés	Pour l'analyse des échantillons à l'aide du logiciel GeneMapper® *ID*, les paramètres de l'analyse et les standards de taille doivent tous deux être réglés sur le type d'analyse « Basic or Advanced » (de base ou avancé). S'ils sont différents, cela provoquera une erreur (Figure 9).
	Trop peu des fragments du standard interne ILS 600 ont été définis. S'assurer de définir au moins un fragment de l'ILS 600 plus petit que le pic le plus petit de l'échantillon ou de l'échelle allélique, et au moins un fragment de l'ILS 600 plus grand que le pic le plus grand de l'échantillon ou de l'échelle allélique.

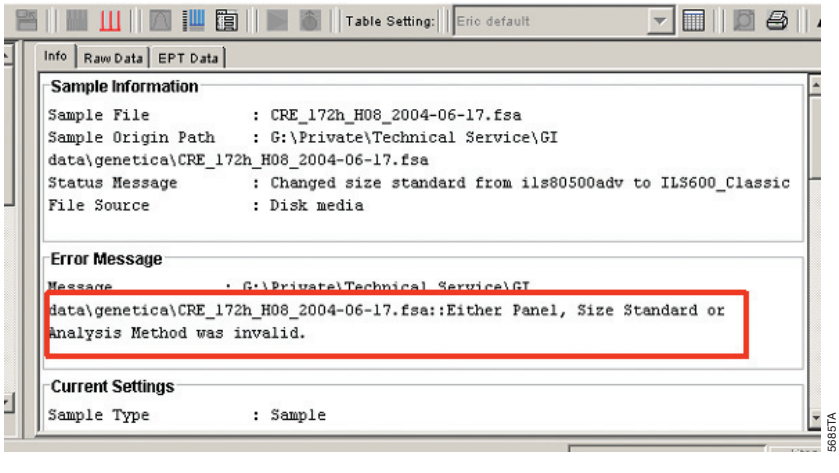

Figure 9. Message d'erreur affiché par le logiciel GeneMapper® *ID* lorsque les types d'analyse des paramètres d'analyse et des standards de taille sont différents.

7.B. Logiciel d'analyse GeneMapper® *ID* (suite)

Symptômes	Causes et commentaires
Allèles non déterminés (suite)	L'électrophorèse n'a pas duré assez longtemps, et les pics de grande taille de l'ILS n'ont pas été capturés. Certains des pics de l'ILS 600 définis dans le standard de taille n'ont pas été détectés au cours de l'électrophorèse. • Créer un nouveau standard de taille utilisant les fragments du contrôle interne présents dans l'échantillon. • Réinjecter les échantillons et prolonger la durée de l'électrophorèse.
Allèles hors-échelle	L'échelle allélique utilisée provient d'une différente série que les échantillons. Réanalyser les échantillons à l'aide d'une échelle allélique de la même série
	Le logiciel GeneMapper® *ID* exige que l'échelle allélique soit importée du même dossier que l'échantillon. S'assurer que l'échelle allélique est bien dans le même dossier que l'échantillon. Créer un nouveau projet et réanalyser, tel que décrit à la Section 6.B ou 6.C.
	Le fichier panel sélectionné pour l'analyse ne correspond pas au système STR utilisé. Attribuer le fichier panel correspondant au système utilisé pour l'amplification.
	L'échelle allélique n'a pas été identifiée comme telle dans la colonne du type d'échantillon.
	Un type d'analyse incorrect a été choisi comme méthode d'analyse. S'assurer d'utiliser le type d'analyse HID.
	Le standard interne n'a pas été identifié correctement dans l'échantillon. Redéfinir manuellement les tailles des fragments du standard de taille de l'échantillon.
Standard de taille pas identifié correctement (Figure 10)	Le point de départ de la plage partielle choisie à la Section 6.B était incorrect. Ajuster le point de départ des données dans la méthode d'analyse. Une plage complète peut également être utilisée pour l'analyse.

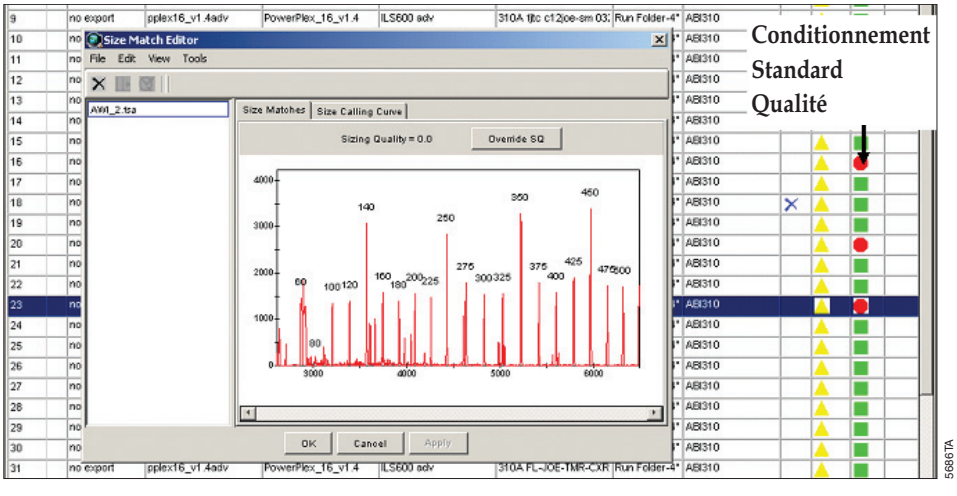

Figure 10. Un exemple de mauvaise attribution des fragments du standard par le logiciel GeneMapper® *ID*.

Symptômes	Causes et commentaires
Standard de taille pas identifié correctement (Figure 10) (suite)	Pics supplémentaires dans le standard de taille en mode avancé. Ouvrir l'éditeur « size match » (correspondance des tailles). Mettre le pic supplémentaire en surbrillance, sélectionner « Edit » puis « delete size label » (supprimer l'annotation de taille). Sélectionner « auto adjust sizes » (auto-ajustement des tailles).
	L'électrophorèse n'a pas duré assez longtemps, et les pics de grande taille de l'ILS n'ont pas été capturés. Certains des pics de l'ILS 600 définis dans le standard de taille n'ont pas été détectés au cours de l'électrophorèse. • Créer un nouveau standard de taille utilisant les fragments du contrôle interne présents dans l'échantillon. • Réinjecter les échantillons et prolonger la durée de l'électrophorèse.
Pics du standard de taille absents	Si les pics se situent en dessous du seuil, diminuer le seuil dans la méthode d'analyse du canal rouge pour inclure les pics.
	Si la qualité de certains pics est mauvaise, redéfinir les standards de taille en omettant ces pics.
Message d'erreur : « Either panel, size standard, or analysis method is invalid » (le panel, le standard de taille ou la méthode d'analyse est non valide).	Le standard de taille et la méthode d'analyse n'étaient pas au même mode, « Classic » (classique) vs « Basic or Advanced » (de base ou avancé). S'assurer que les deux fichiers sont réglés au même mode, soit classique, soit de base ou avancé.
Aucuns allèles attribués, mais pas de message d'erreur	Un panel n'a pas été sélectionné pour l'échantillon. Dans la colonne du panel, sélectionner le panel set approprié pour le système STR utilisé.
	Aucun standard de taille n'a été sélectionné. Sélectionner le standard de taille approprié dans la colonne des standards de taille.
	Le standard de taille n'a pas été défini correctement, ou des pics étaient absents. Redéfinir le standard de taille pour n'inclure que les pics présents dans l'échantillon. Une interruption précoce de l'analyse ou des courtes durées d'électrophorèse provoquent l'absence des pics les plus grands de l'échelle. Ceci entraine le signalement en rouge de la qualité de l'échelle, et aucune taille d'allèle n'est attribuée.
Message d'erreur : « Both the Bin Set used in the Analysis Method and the Panel must belong to the same Chemistry Kit » (le bin set utilisé dans la méthode d'analyse et le panel doivent appartenir au même kit de chimie).	Le bin set attribué à la méthode d'analyse peut avoir été supprimé. Dans le gérant du GeneMapper®, sélectionner l'onglet « Analysis Methods » et ouvrir la méthode d'analyse appropriée. Choisir l'onglet « Allèles », puis sélectionner le correct bin set.
Ligne de base sensiblement élevée	• Mauvais calibrage spectral des analyseurs génétiques ABI PRISM® 3100 et 3100 *Avant* ou Applied Biosystems 3130 et 3130*xl*. Effectuer un nouveau calibrage spectral, puis réinjecter les échantillons. • Matrice de mauvaise qualité pour l'analyseur génétique ABI PRISM® 310. Recommencer et optimiser la matrice.
	Utilisation de la méthode d'analyse classique. L'utilisation du mode d'analyse classique pour les échantillons peut provoquer des lignes de bases comportant plus de bruit que lors de l'analyse à l'aide du mode de base ou avancé. Il est recommandé d'utiliser les méthodes du mode avancé pour l'analyse et les standards de taille.

7.B. Logiciel d'analyse GeneMapper® *ID* (suite)

Symptômes	Causes et commentaires
Une barre rouge s'affiche au cours de l'analyse des échantillons, et le message d'erreur suivant apparaît lorsque les données sont affichées : « Some selected sample(s) do not contain analysis data. Those sample(s) will not be shown » (un ou plusieurs des échantillons sélectionnés ne contiennent aucune donnée d'analyse. Ces échantillons ne seront pas affichés).	Si aucun des échantillon n'avait de matrice attribuée au moment de l'analyse avec l'analyseur génétique ABI PRISM® 310, aucune donnée ne sera affichée. Appliquer un fichier de matrice au cours de l'analyse à l'aide du logiciel GeneMapper® *ID* et réanalyser.
Message d'erreur après avoir tenté d'importer des fichiers panels et bins : « Unable to save panel data: java.SQLEException:ORA-00001: unique constraint (IFA.CKP_NNN) violated » (impossible d'enregistrer les données de panel : java.SQLEException:ORA-00001: contrainte unique [IFA.CKP_NNN] non respectée).	Un conflit existait entre différents sets de fichiers panels et bins. Supprimer tous les panels et bins, puis les réimporter dans un ordre différent.
Des pics de l'échelle allélique sont marqués hors-échelle.	Le logiciel GeneMapper® *ID* n'a pas été utilisé, ou les paramètres de l'analyse de microsatellites ont été utilisés à la place des paramètres d'analyse HID. Le logiciel GeneMapper® n'utilise pas les mêmes algorithmes que le logiciel GeneMapper® *ID* et ne peut pas corriger les différences de tailles de l'échelle allélique. Promega recommande l'utilisation du logiciel GeneMapper® *ID* pour l'analyse des réactions PowerPlex®. Dans le cas du logiciel GeneMapper® *ID*, version 3.2, s'assurer de sélectionner la méthode d'analyse HID. Ceci peut être vérifié en ouvrant la méthode d'analyse à l'aide du gérant GeneMapper®, puis en sélectionnant l'onglet Général. Le type d'analyse ne peut pas être changé. Si la méthode n'est pas HID, il faut la supprimer et créer une nouvelle méthode d'analyse.

7.C. Macro PowerTyper™ S5

Symptômes	Causes et commentaires
Le fichier ne s'ouvre pas dans votre ordinateur.	Le logiciel Genotyper® n'a pas été installé. S'assurer que le logiciel Genotyper®, version 2.5 (Macintosh®) ou version 3.6 ou ultérieure (Windows NT®) est installé.
	Version incorrecte du logiciel Genotyper®. Le macro PowerTyper™ S5 ne fonctionne pas avec les versions du logiciel Genotyper® antérieures à la version 2.5.
	Le fichier a été corrompu en cours de téléchargement. Télécharger à nouveau.
Message d'erreur : « Could not complete the "Run Macro" command because no dye/lanes are selected » (la commande "Exécuter Macro" n'a pas abouti parce qu'aucun marqueur/piste n'est sélectionné)	Les fichiers de l'échantillon d'échelle allélique n'ont pas été identifiés. S'assurer que les colonnes d'info sur les échantillons ou de la couleur de chaque piste comportant le mélange d'échelle allélique PowerPlex® S5 contiennent le mot « ladder ».
	Le macro utilise le mot « ladder » pour identifier les fichiers d'échantillons contenant l'échelle allélique. Toutes les couleurs de marqueurs n'ont pas été importées. Pour le logiciel Genotyper®, versions 2.5 et 3.5 ou ultérieures, régler les préférences (dans le menu Edit) pour importer les couleurs bleu, vert et rouge.

Symptômes	Causes et commentaires
Message d'erreur : « Could not complete the "Run Macro" command because the labeled peak could not be found » (la commande "Exécuter Macro" n'a pas abouti parce qu'aucun pic marqué n'a été trouvé)	La hauteur du pic d'un ou de plusieurs allèles du fichier de l'échelle allélique était en dessous de 150 RFU. Les catégories des échelle alléliques sont définies comme ayant un pic de 150 RFU de hauteur au minimum. Si la hauteur des pics de l'échelle allélique est en dessous de 150 RFU, le logiciel sera incapable d'identifier les pics d'allèles. Recommencer l'échelle allélique en utilisant une quantité plus élevée d'échantillon ou une durée d'injection plus longue pour obtenir des pics au dessus de 150 RFU.
	Des pointes d'ÉC dans l'échelle allélique ont été identifiés comme allèles par le macro. Utiliser une injection différente de l'échelle allélique.
	Les allèles TH01 9,3 et 10 n'ont pas été séparés lors de l'utilisation du paramètre d'analyse de lissage fort (heavy smoothing) du logiciel GeneScan®. Utiliser le paramètre d'analyse de lissage léger (light smoothing) du GeneScan®.
	Les tailles des allèles de l'échelle allélique en paires de bases sont en dehors de la plage de catégorie définie. S'assurer que l'attribution des tailles des fragments du standard interne est correcte. Définir à nouveau les fragments du standard interne et réanalyser les échantillon à l'aide du logiciel GeneScan®. Comparer la taille de l'allèle le plus petit de l'échelle allélique avec les plages de taille en paires de bases indiquées dans les catégories du même allèle. Si nécessaire, augmenter la plage de départ de la catégorie (dans la fenêtre de catégorie) à > ± 6 pb, et enregistrer le macro sous un autre nom.
	Les pics de l'échelle allélique étaient trop hauts, entraînant l'attribution de pics de bégayement comme des pics d'allèles. Utiliser une durée d'injection plus courte, diminuer la quantité d'échelle allélique utilisée ou réanalyser l'échantillon d'échelle allélique avec des seuils d'amplitude de pics plus élevés dans les paramètres d'analyse de GeneScan®.
	Les données de l'échelle allélique n'étaient pas compatibles avec le fichier PowerTyper™ utilisé. Confirmer que le fichier du macro PowerTyper™ correspond à l'échelle allélique utilisée.
La fenêtre des graphiques ou le tableau des allèles n'affiche pas toutes les données	Les macros n'ont pas été exécutés dans le bon ordre. Utiliser l'option de filtre macro POWER ou POWER 20%.
	Les trois couleurs de marqueurs n'ont pas toutes été importées. Pour le logiciel Genotyper®, versions 2.5 et 3.5 ou ultérieures, régler les préférences (dans le menu Edit) pour importer les couleurs bleu, vert et rouge.
Le macro « Check ILS » affiche une fenêtre de graphique vide	Les trois couleurs de marqueurs n'ont pas toutes été importées. Pour le logiciel Genotyper®, versions 2.5 et 3.5 ou ultérieures, régler les préférences (dans le menu Edit) pour importer les couleurs bleu, vert et rouge.
Pics hors-échelle	Migration des échantillons légèrement changée au cours d'une série d'ÉC comportant de nombreux échantillons. Ceci peut être dû à des changements de températures ou de la colonne d'ÉC au fil du temps. Utiliser une injection différente de l'échelle allélique pour la détermination des tailles avec le macro PowerTyper™ S5. Ne pas utiliser la première injection d'une nouvelle colonne pour l'échantillon d'échelle.
	La taille des allèles en paires de bases était incorrecte parce que des tailles erronées ont été attribuées aux fragments du standard interne. Vérifier si les fragments du standard interne ont été correctement attribués. Réanalyser l'échantillon à l'aide du logiciel GeneScan®, et redéfinir les fragments du standard interne.

8. Références

1. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: Polymorphic loci, detection systems, and population genetics. In: *The Second International Symposium on Human Identification 1991*, Promega Corporation, 31–52.

2. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 746–56.

3. Edwards, A. *et al.* (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**, 241–53.

4. Warne, D. *et al.* (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human β-actin related pseudogene 2 (actbp2) detected using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6980.

5. Ausubel, F.M. *et al.* (1993) Unit 15: The polymerase chain reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publishing Associates Inc. and John Wiley and Sons, NY.

6. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Chapter 14: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

7. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (1989) Erlich, H.A., ed., Stockton Press, New York, NY.

8. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (1990) Innis, M.A. *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, CA.

9. Presley, L.A. *et al.* (1992) The implementation of the polymerase chain reaction (PCR) HLA DQ alpha typing by the FBI laboratory. In: *The Third International Symposium on Human Identification 1992*, Promega Corporation, 245–69.

10. Hartmann, J.M. *et al.* (1991) Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest* **18**, 44–75.

11. Revised Validation Guidelines: Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM) (2004) *Forensic Science Communications* **6**, obtenu sur internet le 3 décembre 2007 à l'adresse : www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/standards/2004_03_standards02.htm

12. Moos, M. and Gallwitz, D. (1983) Structure of two human β-actin related processed genes, one of which is located next to a simple repetitive sequence. *EMBO J.* **2**, 757–61.

13. Polymeropoulos, M.H. *et al.* (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human β-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Res.* **20**, 1432.

14. Schneider, H.R. *et al.* (1998) ACTBP2-nomenclature recommendations of GEDNAP. *Int. J. Leg. Med.* **111**, 97–100.

15. Department of Serology of the medical faculty at the Heinrich-Heine-University of Duesseldorf. *SE33 population statistics.* (www.uni-duesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/SE33b.htm).

16. Levedakou, E. *et al.* (2001) Allele frequencies for fourteen STR loci of the PowerPlex™ 1.1 and 2.1 Multiplex Systems and Penta D locus in Caucasians, African-Americans, Hispanics and other populations of the United States of America and Brazil. *J. Forensic Sci.* **46**, 736–61.

17. Lins, A.M. *et al.* (1998) Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. *J. Forensic Sci.* **43**, 1168–80.

18. Puers, C. *et al.* (1993) Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic STR locus HUMTH01[AATG]n and reassignment of alleles in population analysis using a locus-specific allelic ladder. *Am. J. Human Genet.* **53**, 953–8.

19. Hammond, H. *et al.* (1994) Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 175–89.

20. Bever, R.A. and Creacy, S. (1995) Validation and utilization of commercially available STR multiplexes for parentage analysis. In: *Proceedings from the Fifth International Symposium on Human Identification 1994*. Promega Corporation, 61–8.

21. Sprecher, C.J. *et al.* (1996) A general approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques* **20**, 266–76.

22. Lins, A.M. *et al.* (1996) Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci—silver stain and fluorescent detection. *BioTechniques* **20**, 882–9.

23. Jones, D.A. (1972) Blood samples: Probability of discrimination. *J. Forensic Sci. Soc.* **12**, 355–9.

24. Brenner, C. and Morris, J.W. (1990) In: *Proceedings from the International Symposium on Human Identification 1989*, Promega Corporation, 21–53.

25. Griffiths, R. *et al.* (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.* **111**, 267–72.

26. Bär, W. *et al.* (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175–6.

27. Gill, P. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci. Int.* **87**, 185–92.

28. Frégeau, C.J. *et al.* (1995) Characterization of human lymphoid cell lines GM9947 and GM9948 as intra- and interlaboratory reference standards for DNA typing. *Genomics* **28**, 184–97.

29. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203–21.

30. Schlotterer, C. and Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 211–5.

31. Smith, J.R. *et al.* (1995) Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase. *Genome Res.* **5**, 312–7.

32. Magnuson, V.L. *et al.* (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by *Taq* DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* **21**, 700–9.

33. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2807–12.

34. Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B. (1994) Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Leg. Med.* **106**, 319–23.

35. Brinkmann, B., Moller A. and Wiegand, P. (1995) Structure of new mutations in 2 STR systems. *Int. J. Leg. Med.* **107**, 201–3.

36. Mandrekar, P.V., Krenke, B.E. and Tereba, A. (2001) DNA IQ™: The intelligent way to purify DNA. *Profiles in DNA* **4**(3), 16.

37. Krenke, B.E. *et al.* (2005) Development of a novel fluorescent two-primer approach to quantitative PCR. *Profiles in DNA* **8**(1), 3–5.

38. Greenspoon, S. and Ban, J. (2002) Robotic extraction of sexual assault samples using the Biomek® 2000 and the DNA IQ™ System. *Profiles in DNA* **5**(1), 3–5.

39. McLaren, B., Bjerke, M. and Tereba, A. (2006) Automating the DNA IQ™ System on the Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation. *Profiles in DNA* **9**(1), 11–13.

40. Cowan, C. (2006) The DNA IQ™ System on the Tecan Freedom EVO® 100. *Profiles in DNA* **9**(1), 8–10.

41. Bjerke, M. *et al.* (2006) Forensic application of the Maxwell™ 16 Instrument. *Profiles in DNA* **9**(1), 3–5.

42. Mandrekar, P. et al. (2007) Introduction to Maxwell® 16 low elution volume configuration for forensic casework. *Profiles in DNA* **10**(2), 10–12.

Des références supplémentaires sur les STR se trouvent au site : **www.promega.com/geneticidentity/**

9. Annexe

9.A. Avantages de l'utilisation des locus inclus dans le système PowerPlex® S5

Les locus inclus dans le système PowerPlex® S5 (Tableaux 2 et 3) ont été choisis pour comprendre quatre des sept locus ENFSI actuels (12-24) et quatre des locus CODIS actuels. En outre, le locus de l'amélogénine est inclus au système PowerPlex® S5 pour permettre l'identification du sexe de chaque échantillon. Le tableau 4 présente les allèles du système PowerPlex® S5 observés dans des ADN matrices standards couramment disponibles.

Tableau 2. Informations spécifiques aux locus du système PowerPlex® S5.

Locus STR	Marqueur	Localisation chromosomique	Locus GenBank® et définition du locus	Séquence répétée[1] 5´→3´
D8S1179	FL	8q	S/O	Complexe TCTA (25)
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA (25)
Amélogénine[2]	FL	Xp22.1–22.3 et Y	HUMAMEL, gène du chromosome Y humain codant pour une protéine semblable à l'amélogénine	S/O
FGA	JOE	4q28	HUMFIBRA, gène la chaîne alpha du fibrinogène humain	Complexe TTTC (25)
TH01	JOE	11p15.5	HUMTH01, gène de la tyrosine hydroxylase humaine	AATG (25)

[1]Le rapport du mois d'août 1997 (26,27) de Commission sur l'ADN de l'International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH) décrète que 1) Pour les locus STR au sein de gènes codants, le brin sens sera utilisé et le motif de séquence répétée défini selon le premier nucléotide possible en 5´ d'un motif répété ; et 2) Pour les locus STR non associés aux gènes codants, la première entrée dans une banque de données ou la première description dans un article original sera utilisée.

[2]L'amélogénine n'est pas un STR, mais ce locus présente une bande de 103 bases spécifique au chromosome X et une bande de 109 bases spécifique au chromosome Y.

FL = fluorescéine

JOE = 6-carboxy-4´,5´-dichloro-2´,7´-dimethoxyfluorescéine

Tableau 3. Informations spécifiques à l'échelle allélique du système PowerPlex® S5.

Locus STR	Marqueur	Plage de taille des constituants de l'échelle allélique[1] (bases)	Nombres d'unités répétées des constituants de l'échelle allélique
D8S1179	FL	208–252	7–18
D18S51	FL	123–199	8–10, 10,2, 11–13, 13,2, 14–27
Amélogénine[2]	FL	103, 109	X, Y
FGA	JOE	148–270	16–18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23, 23,2, 24, 24,2, 25, 25,2, 26–30, 31,2, 43,2, 44,2, 45,2, 46,2
TH01	JOE	93–132	4–9, 9,3, 10–11, 13,3

[1]Lorsqu'un standard interne comme l'ILS 600 est utilisé, les tailles calculées des composants de l'échelle allélique peuvent être différentes de celles indiquées dans le tableau. Ce phénomène se produit en raison des séquences différentes des composants de l'échelle allélique et des constituants de l'ILS, pouvant entraîner des différences de migration. Le marqueur fluorescent affecte également la migration des allèles.

[2]L'amélogénine n'est pas un STR, mais ce locus présente une bande de 103 bases spécifique au chromosome X et une bande de 109 bases spécifique au chromosome Y.

Tableau 4. Détermination par le système PowerPlex® S5 des allèles dans des ADN matrices standards couramment disponibles.

	ADN matrices standards[1]			
Locus STR	**K562**	**9947A**	**9948**	**2800M**
D8S1179	12, 12	13, 13	12, 13	14, 15
D18S51	15, 16	15, 19	15, 18	16, 18
Amélogénine	X, X	X, X	X, Y	X, Y
FGA	21, 24	23, 24	24, 26	20, 23
TH01	9,3, 9,3	8, 9,3	6, 9,3	6, 9,3

[1]Des informations sur les souches 9947A, 9948 et K562 sont disponibles au site : locus.umdnj.edu/nigms La souche K562 est disponible auprès de l'American Type Culture Collection : www.atcc.org (Manassas, VA, États-Unis). Des information au sujet de l'utilisation des ADN 9947A et 9948 comme ADN matrices standards sont présentées à la référence 28.

Nous avons sélectionné les amorces avec soin pour éviter ou minimiser les artéfacts, y compris ceux associés à l'ADN polymérase *Taq* tels que les dérapages au niveau des répétitions et l'ajout d'un nucléotide terminal. Les dérapages au niveau des répétitions (29, 30), parfois appelés « bandes n–4 », « bégayements » ou « bandes d'ombre », sont provoqués par la perte d'une unité répétée au cours de l'amplification de l'ADN et/ou par des variations somatiques de l'ADN. L'étendue de cet artéfact dépend principalement du locus et de la séquence d'ADN amplifiée.

L'ajout d'un nucléotide terminal (31, 32) se produit lorsque l'ADN polymérase *Taq* ajoute un nucléotide, en général l'adénine, aux extrémités 3' des fragments d'ADN amplifiés, indépendamment de la matrice. L'efficacité de cette réaction varie selon la séquence des amorces. Ainsi, une bande d'artéfact plus courte d'une base par rapport à la taille attendue (c.à.d., manquant l'ajout terminal) s'observe parfois. Nous avons modifié les séquences des amorces et ajouté une étape d'extension finale de 45 minutes à 60 °C (33) au protocole d'amplification pour favoriser l'ajout du nucléotide terminal et rendre celui-ci essentiellement complet lorsque la quantité recommandée d'ADN matrice est utilisée.

La présence d'allèles microvariants (des allèles qui diffèrent l'un de l'autre par des tailles ne correspondant pas à la longueur des répétitions) complique l'interprétation et l'attribution des allèles. Il semble y avoir une corrélation entre un haut degré de polymorphisme, une tendance aux microvariants et à un taux accru de mutations (34, 35). FGA et D18S51 comportent de nombreux microvariants relativement courants.

9.B. Méthodes d'extraction et de quantification de l'ADN

Le système DNA IQ™ (réf. DC6700) est un système d'isolement et de quantification de l'ADN spécifiquement conçu pour les échantillons de médecine légale et de tests de paternité (36). Ce système innovant utilise des particules paramagnétiques pour préparer de façon pratique et efficace des échantillons purs pour les analyses STR, et peut être utilisé pour extraire l'ADN d'échantillons de taches ou de liquides, tels que le sang et les solutions. La résine DNA IQ™ élimine les inhibiteurs de la PCR et les contaminants souvent présents dans les échantillons d'études de cas. Dans le cas des échantillons plus abondants, le système DNA IQ™ produit une quantité constante d'ADN total. Le système a été utilisé pour isoler et quantifier l'ADN provenant de types d'échantillons de routine, y compris des écouvillons buccaux, des taches sur papier FTA® et du sang liquide. En outre, de l'ADN a été isolé à partir d'échantillons d'études de cas comme des tissus, des échantillons d'agression sexuelle après extraction différentielle et des taches sur matériaux de support. Le système DNA IQ™ a été testé en association avec les systèmes PowerPlex® pour garantir un processus simplifié. Reportez-vous à la section 9.F pour les informations au sujet des commandes.

Pour les applications nécessitant la quantification de l'ADN spécifique humain, le système Plexor® HY (réf. DC1001, DC1000) a été développé (37). Reportez-vous à la section 9.F pour les informations au sujet des commandes.

Le système DNA IQ™ a été complètement automatisé sur les appareils suivants : Beckman Coulter Biomek® 2000 Laboratory Automation Workstation (38), Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation (39) et Tecan Freedom EVO® Liquid Handler (40). De plus, le kit d'échantillons de référence DNA IQ™ Reference Sample Kit pour Maxwell® 16 (réf. AS1040) et le kit d'échantillons d'étude de cas DNA IQ™ Casework Sample Kit pour Maxwell® 16 sont également disponibles (41, 42). Pour des rensei-gnements sur l'automatisation des procédés de laboratoire sur postes de travail automatisés, adressez-vous à une succursale ou un distributeur Promega local (coordonnées disponibles au site : **www.promega.com/worldwide/** ou par courriel : **genetic@promega.com**

9.C. Internal Lane Standard 600 (standard interne)

Le standard interne (Internal Lane Standard, ILS) 600 contient 22 fragments d'ADN d'une taille de 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 et 600 bases (Figure 11). Dans le cas des analyses PowerPlex® S5, seuls les fragments de l'ILS 600 en dessous de 350 pb doivent être détectés. Chaque fragment est marqué à la carboxy-X-rhodamine (CXR) et peut être détecté séparément en présence de matériel amplifié du système PowerPlex® S5. L'ILS 600 est conçu pour être utilisé dans chaque injection de l'ÉC pour augmenter la précision des analyses à l'aide du système PowerPlex® S5.

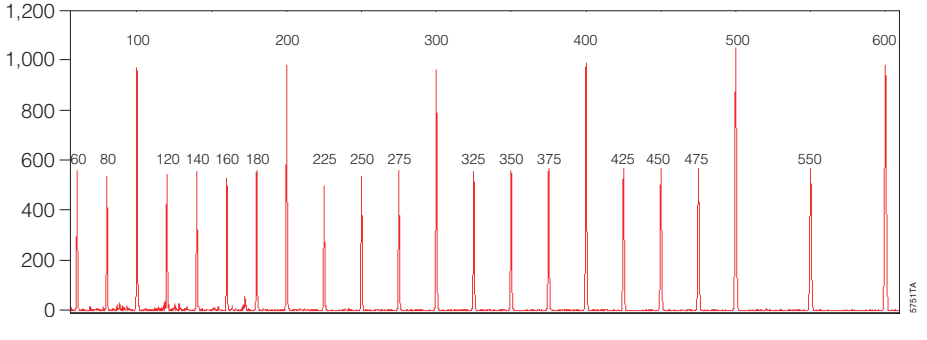

Figure 11. Standard interne (Internal Lane Standard) 600 Un électrophérogramme des fragments du standard interne 600.

9.D. Préparation du mélange d'amplification PCR pour le système PowerPlex® S5

Une fiche de calcul de la quantité nécessaire de chaque composant du mélange d'amplification PCR est fournie au Tableau 5. Déterminez le nombre de réactions à effectuer. Ceci doit comprendre les réactions de contrôles positifs et négatifs. Ajoutez une ou deux réactions à ce nombre pour tenir compte des erreurs de pipetage. Multipliez le volume (µl) par réaction par le nombre total de réactions pour obtenir le volume final du mélange d'amplification PCR (µl).

Tableau 5. Mélange d'amplification PCR pour les réactions du système PowerPlex® S5.

Composant du mélange d'amplification PCR	Volume par réaction	×	Nombre de réactions	=	Volume final (µl)
Eau de qualité amplification[1]	µl	×		=	
PowerPlex® S5 5X Master Mix	5,0 µl	×		=	
PowerPlex® S5 10X Primer Pair Mix	2,5 µl	×		=	
Par tube					
volume d'ADN matrice (0,25–0,50 ng)	jusqu'à 17,5 µl	×		=	
volume total de réaction	25 µl	×		=	

[1]Le volume total du mélange d'amplification PCR et de l'ADN matrice doit être 25 µl.

9.E. Composition des tampons et solutions

Tampon TE^{-4} (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA [pH 8,0])

2,21 g	Tris base
0,037 g	EDTA ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)

Dissoudre le Tris base et l'EDTA dans 900 ml d'eau déionisée. Ajuster le pH à 8,0 avec de l'HCl. Ajuster le volume final à 1 litre avec de l'eau déionisée.

9.F. Produits associés

Systèmes STR multiplex fluorescents

Produit	Conditionnement	Réf.
PowerPlex® 16 System	100 réactions	DC6531
	400 réactions	DC6530
PowerPlex® 16 BIO System	100 réactions	DC6541
	400 réactions	DC6540
PowerPlex® Y23 System	50 réactions	DC2305
	200 réactions	DC2320
PowerPlex® ES System	100 réactions	DC6731
	400 réactions	DC6730

Non prévu pour le diagnostic médical.

Composants associés

Produit	Conditionnement	Réf.
PowerPlex® Matrix Standards, 310*	50 µl (chaque marqueur)	DG4640
PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130*	25 µl (chaque marqueur)	DG4650
2800M Control DNA*	25 µl	DD7101
	500 µl	DD7251
9947A DNA*	250 ng	DD1001
Internal Lane Standard 600**	150 µl	DG1071
Eau de qualité amplification**	6 250 µl (5 × 1 250 µl)	DW0991

*Non prévu pour le diagnostic médical.
**Pour usage en laboratoire.

Systèmes de préparation des échantillons

Produit	Conditionnement	Réf.
DNA IQ™ System**	100 réactions	DC6701
	400 réactions	DC6700
Differex™ System*	50 échantillons	DC6801
	200 échantillons	DC6800
Maxwell® 16 Instrument**	1 appareil	AS2000
DNA IQ™ Reference Sample Kit for Maxwell® 16***	48 préparations	AS1040
DNA IQ™ Casework Sample Kit for Maxwell® 16***	48 préparations	AS1210
Plexor® HY System*	200 déterminations	DC1001
	800 déterminations	DC1000
Slicprep™ 96 Device**	paquet de 10	V1391

*Non prévu pour le diagnostic médical.
**Pour usage en laboratoire.
***Réservé à la recherche. N'est pas destiné à une utilisation dans le cadre de procédures de diagnostic.

Cônes de pipettes résistants aux aérosols ART® (Aerosol-Resistant Tips)

Produit	Volume	Conditionnement (cônes/paquet)	Réf.
ART® 10 Ultramicro Pipet Tip	0,5–10 µl	960	DY1051
ART® 20E Ultramicro Pipet Tip	0,5–10 µl	960	DY1061
ART® 20P Pipet Tip	20 µl	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100 µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100 µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100 µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200 µl	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1000 µl	800	DY1131

[a] Les locus STR font l'objet du brevet américain nº RE 37 984, du brevet allemand nº DE 38 34 636 C2 et d'autres brevets attribués au Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V., Allemagne. Le développement et l'utilisation des locus STR sont protégés par le brevet américain nº 5 364 759, le brevet australien nº 670231 et d'autres brevets en attente attribués au Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Les brevets concernant le processus de PCR de fondation, brevets européens nº 201 184 et 200 362, ont expiré le 28 mars 2006. Aux États-Unis, les brevets protégeant le processus de PCR de fondation ont expiré le 29 mars 2005.

[b]Ce produit est vendu en vertu de contrats de licence avec USB Corporation. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits limités, non transférables en vertu du dépôt de brevet américain de numéro de série 11/171,008 appartenant à USB Corporation, permettant l'utilisation de la quantité de ce produit strictement nécessaire à la pratique des revendications dudit brevet uniquement pour les activités des utilisateurs finaux dans les domaines de la recherche sur les sciences de la vie et l'analyse pour la médecine légale du matériel génétique lié ou obtenu en conséquence d'enquêtes criminelles ou sur des lieux de catastrophes et menée soit par ou au nom d'une entité gouvernementale, soit pour l'utilisation dans ou la préparation de procédures judiciaires, ainsi que la compilation et l'indexation des résultats d'une telle analyse, et l'analyse dans le but de la déter-mination de la filiation (le « domaine d'application pour la médecine légale et l'identité génétique »). Le domaine d'application pour la médecine légale et l'identité génétique exclut spécifiquement le typage des tissus associé aux procédures de greffe ou à d'autres procédures médicales. Des informations supplé-mentaires relatives à la licence peuvent être obtenues en contactant USB Corporation, 26111 Miles Road, Cleveland, OH 44128, États-Unis.

[c]Ce produit est vendu en vertu de contrats de licence avec Stratagene. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits limités, non transférables en vertu des brevets américains no 5 449 603, 5 605 824, 5 646 019 et 5 773 257 appartenant à Stratagene, permettant l'utilisation de la quantité de ce produit strictement nécessaire à la pratique des revendications dudit brevet uniquement pour les activités des utilisateurs finaux dans les domaines de la recherche sur les sciences de la vie et l'analyse pour la médecine légale du matériel génétique lié ou obtenu en conséquence d'enquêtes criminelles ou sur des lieux de catastrophes et menée soit par ou au nom d'une entité gouvernementale, soit pour l'utilisation dans ou la préparation de procédures judiciaires, ainsi que la compilation et l'indexation des résultats d'une telle analyse, et l'analyse dans le but de la détermination de la filiation (le « domaine d'application pour la médecine légale et l'identification génétique »). Le domaine d'application pour la médecine légale et l'iden-tité génétique exclut spécifiquement le typage des tissus associé aux procédures de greffe ou à d'autres procédures médicales. Des informations supplémentaires relatives à la licence peuvent être obtenues en contactant le Service du développement des affaires (Business Development Department), Stratagene California, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 9203, États-Unis.

© 2008 Promega Corporation. Tous droits réservés.

Maxwell, Plexor and PowerPlex sont des marques déposées de Promega Corporation. Differex, DNA IQ, PowerTyper et Slicprep sont des marques de commerce de Promega Corporation.

ABI PRISM, GeneMapper, GeneScan, Genotyper et MicroAmp sont des marques déposées d'Applera Corporation. ART est une marque déposée de Molecular Bio-Products, Inc. Biomek est une marque déposée de Beckman Coulter, Inc. FTA est une marque déposée de Flinders Technologies, Pty, Ltd., sous licence de Whatman. Freedom EVO est une marque déposée de Tecan AG Corporation. GenBank est une marque déposée de l'U.S. Dept. of Health and Human Services (Département de la Santé et des Services sociaux des États-Unis). GeneAmp est une marque déposée de Roche Molecular Systems, Inc. Hi-Di et POP-4 sont des marques de commerce d'Applera Corporation. Macintosh est une marque déposée d'Apple Computer, Inc. Microsoft, Windows et Windows NT sont des marques déposées de Microsoft Corporation.

Les produits peuvent être protégés par des brevets en instance ou déposés, ou peuvent présenter certaines restrictions. Veuillez visiter notre site Internet pour de plus amples informations.

Tous les prix et toutes les caractéristiques sont sujets à modification sans avis préalable.

Les déclarations relatives aux produits sont sujettes à modification. Veuillez contacter le service technique de Promega ou consulter le catalogue en ligne de Promega pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits Promega.